

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WIDÉN, Björn
Pharmacia & Upjohn AB
S-112 87 Stockholm
SUÈDE

BEST AVAILABLE COPY

Date of mailing (day/month/year) 08 September 1999 (08.09.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference Pha-1796-PCT	
International application No. PCT/SE98/02464	International filing date (day/month/year) 30 December 1998 (30.12.98)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☒ the agent ☐ the common representative

Name and Address

WIDÉN, Björn
Pharmacia & Upjohn AB
Patent Dept.
S-751 82 Uppsala
Sweden

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

46 18 16 30 00

Facsimile No.

46 18 12 60 77

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

WIDÉN, Björn
Pharmacia & Upjohn AB
S-112 87 Stockholm
Sweden

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

+46 8 695 80 00

Facsimile No.

+46 8 695 42 78

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Maria Kirchner

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

08 September 1999 (08.09.99)

International application No.

PCT/SE98/02464

Applicant's or agent's file reference

Pha-1796-PCT

International filing date (day/month/year)

30 December 1998 (30.12.98)

Priority date (day/month/year)

30 December 1997 (30.12.97)

Applicant

MENDEL-HARTVIG, Ib et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

23 July 1999 (23.07.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

BEST AVAILABLE COPY

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Maria Kirchner

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REC'D 27 APR 2000

WIPO PCT

Applicant's or agent's file reference Pha-1796-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/SE98/02464	International filing date (day/month/year) 30.12.1998	Priority date (day/month/year) 30.12.1997
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC ₇ G 01 N 33/53		
Applicant Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB et al		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23.07.1999	Date of completion of this report 04.04.2000
Name and mailing address of the IPEA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. 08-667 72 88	Authorized officer Hampus Rystedt/ELY Telephone No. 08-782 25 00

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/SE98/02464

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☒ the international application as originally filed.

☐ the description, pages _____, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.

☐ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.

☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/SE98/02464

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	<u>10, 15, 16, 19</u>	YES
	Claims	<u>1-9, 11-14, 17, 18, 20-31</u>	NO
Inventive step (IS)	Claims	<u></u>	YES
	Claims	<u>1-31</u>	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	<u>1-31</u>	YES
	Claims	<u></u>	NO

2. Citations and explanations

The present application relates to a method for determining an analyte in a sample, utilising biospecific binding of the analyte to a detectable reactant. The method is characterised by the use of an predeposited immobilised calibrator, or a substance capable of binding the calibrator, for internally calibrating the quantity of analyte in the sample.

The following document is considered to be of particular relevance:

D1: WO-A1-9516914

D1 describes a sensor device for biospecific binding assays of the same type as the present application describes. D1 teaches the use of a "reference zone", corresponding to the calibrator zone of the present application, in which a specific binding partner for the analyte is immobilised. The reference zone also contains an analyte analogue and a labelled substance with specific affinity for the analyte analogue, see claim 1. Claims 1-6 and 11-14, 17 and 18 thus lack novelty with regard to D1.

The device may be a lateral flow matrix, see page 5 lines 7-11. Therefore claim 7 lack novelty.

According to page 7 lines 6-15, multiple measurement zones for different assays may be employed. The different assays may be sequential or simultaneous. If they are carried out simultaneously, they have to be in different process flows (as the reference zones are discrete and non-overlapping). Claims 8 and 9 consequently lack novelty.

.../...

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/SE98/02464

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: V.

A person skilled in the art is likely to try optimize the positioning of the application, detection and calibration zones. Claims 10 and 15 are therefore not considered to involve an inventive step. The use of particles as a detectable group, according to claim 16, is considered a standard technique, as is the use of the method for diagnosing allergy or autoimmune disease. Claims 16 and 19 thus lack inventive step.

The device and test kit according to claims 20-31 implement the method according to claims 1-19 and lack novelty for the same reasons as stated above.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No. PCT/ SE 98 / 02464

International Filing Date 30-12-1998

The Swedish Patent Office
PCT International Application

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) Pha-1796-PCT

Box No. I TITLE OF INVENTION

Method using a new calibrator and a device and test kit including the calibrator.

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB
SE-751 82 UPPSALA
Sweden

☐ This person is also inventor.

Telephone No.
+46 18 16 30 00

Facsimile No.
+46 18 14 03 58

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:
SEState (that is, country) of residence:
SE

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Mendel-Hartvig, Ib
Rabeniusvägen 28
SE-756 55 UPPSALA
Sweden

This person is:

☐ applicant only☒ applicant and inventor☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)State (that is, country) of nationality:
SEState (that is, country) of residence:
SE

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent ☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Widén, Björn both with the address:
Svanström, Pär Pharmacia & Upjohn AB
Patent Department
SE-751 82 UPPSALA
Sweden

Telephone No.
+46 18 16 30 00

Facsimile No.
+46 18 12 60 77

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

CORRECTED

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS 30 -12- 1998

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Gustafsson, Jörgen
Tunagatan 7D
SE-753 37 UPPSALA
Sweden

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

SE

State (that is, country) of residence:

SE

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☒ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☐ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☐ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☐ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

B x No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☐ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☐ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☐ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):


- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albania | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Armenia | <input type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input type="checkbox"/> AT Austria | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgaria | |
| <input type="checkbox"/> BR Brazil | <input type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NO Norway |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba | <input type="checkbox"/> PL Poland |
| <input type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> DE Germany | <input type="checkbox"/> RO Romania |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark | <input type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> EE Estonia | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> ES Spain | <input type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input type="checkbox"/> FI Finland | <input type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input type="checkbox"/> GE Georgia | <input type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> HR Croatia | <input type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input type="checkbox"/> HU Hungary | <input type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesia | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IS Iceland | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | <input type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KR Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

30 -12- 1998

Box N . VI PRIORITY CLAIM					<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:			
		national application: country	regional application:* regional Office	international application: receiving Office	
item (1) 30 December 1997	9704933-2	SE			
item (2)					
item (3)					
<input checked="" type="checkbox"/> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1)					
<small>* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.</small>					
Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY					
Choice of International Searching Authority (ISA) <small>(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):</small>		Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):			
ISA / SE		Date (day/month/year) 30 December 1997	Number SE97/01646	Country (or regional Office)	
Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING					
This international application contains the following number of sheets: request : 4 ✓ description (excluding sequence listing part) : 29 ✓ claims : 7 ✓ abstract : 1 ✓ drawings : sequence listing part of description : Total number of sheets : 41		This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet 2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney 3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: 295 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): 7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. <input type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. <input checked="" type="checkbox"/> other (specify): ITS SE97/01646			
Figure of the drawings which should accompany the abstract:		Language of filing of the international application: Swedish			
Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT					
Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).					
 Björn Widén					

For receiving Office use only		30 -12- 1998
1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: <input type="checkbox"/> received: <input checked="" type="checkbox"/> not received:	
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / SE	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	

For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	11 FEBRUARY 1999 (11. 02. 99)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**METOD SOM UTNYTTJAR EN NY KALIBRATOR OCH ANORDNING OCH
TESTKIT SOM INNEHÅLLER KALIBRATORN**

Teknikområde

5 Uppfinningen avser ett sätt vid metod för bestämning av en analyt i ett prov som innebär att man utnyttjar biospecifika affinitetsreaktioner. I metoden ingår stegen att:

- i. man bildar ett komplex som innehåller:
 - 10 Reaktant I---Analyt'---Reaktant*, där
 - a. Reaktant* och Reaktant I uppvisar biospecifik affinitet mot Analyt', och
 - b. Reaktant* är analytiskt detekterbar,
 - varefter
 - 15 ii. man bestämmer den detekterbara signalen från Reaktant* i komplexet (provvärde), och
 - iii. man erhåller mängden analyt i provet genom att jämföra provvärdet med motsvarande signal(er) (kalibratorvärde(n)) från Reaktant*, som separat
 - 20 fått binda till en eller flera mängder av en kalibrator (kalibratormängder), vilka var och en svarar mot en känd mängd analyt (standardmängd(er)).
- Analyt' är analyten som sådan (i provet) eller en analyt-relaterad reaktant, d.v.s. en tillsatt biospecifik
- 25 affinitetsreaktant, som ingår i komplexet i en mängd som är relaterad till mängden analyt i provet. Reaktant* och Reaktant I kan binda Analyt' samtidigt. Detta innebär att de binder till rumsligt åtskilda bindningsställen.
- Denna typ av analysmetoder har bland annat genomförts i
- 30 s.k. flödesmatriser, varvid reaktanter inklusive analyt transporteras i ett processflöde genom matrisen (= flödesmetodik) till en detektionszon (DZ) där Reaktant* fångas upp i en mängd som är relaterad till mängden analyt i provet. Uppfångning sker via en reaktant (Fångare) som är
- 35 fast förankrad till matrisen i DZ. Fångaren kan vara Reaktant I eller en reaktant, som har biospecifik affinitet mot Reaktant I eller mot en annan reaktant, vilken i sin

THIS PAGE BLANK (USPTO)

tur, eventuellt via en eller flera ytterligare reaktanter, har biospecifik affinitet mot Reaktant I.

Med reaktanter (inkluderande analyt), som uppvisar biospecifik affinitet (bioaffina reaktanter) avses enskilda medlemmar i reaktantparen: antigen/hapten - antikropp; biotin-avidin/ streptavidin; två komplementära enkelkedjor av nukleinsyra etc. Till antikroppar räknas antigen-bindande antikroppsfragment såsom Fab, F(ab)₂', enkelkedje-Fv-antikroppar (scFv) etc. Aktuella reaktanter behöver inte vara naturligt förekommande utan kan även vara syntetiskt framställda molekyler/bindare.

Den aktuella typen av testmetodik har tidigare främst utnyttjats för biospecifika affinitetsreaktanter där minst den ena i ett utnyttjat reaktantpar har uppvisat proteinstruktur, speciellt i samband med så kallade immunkemiska bestämningsförfaranden.

Biospecifika affinitetsreaktioner utföres främst i vattenhaltiga medier (exempelvis vatten).

20 Tidigare utnyttjade kalibratorer

I konventionell teknik har kalibratorn och analyt ofta båda kunnat binda till Reaktant*. Aktuella bindningsställen på kalibratorn för bindning till Reaktant* har ofta ekvivalenta bindningsegenskaper med motsvarande bindningsställen på analyten. Detta innebär i praktiken att kalibratorn och analyten har haft bindningsställen, som är strukturellt lika eller snarlika och korsreagerar med varandra gentemot Reaktant*. Bindningsställen som korsreagerar med varandra om en given reaktant är ekvivalenta.

Kalibratormängd har enligt tidigare känd teknik vanligen varit samma som standardmängd.

Kalibratorvärden, som svarar mot olika analytmängder/koncentrationer (standardmängder), har ofta sammanställs till en dos-responskurva (kalibreringskurva) eller en algoritm.

I begreppet "att jämföra ett provvärde med kalibratorvärde(n)" har även ingått att jämförelsen kan ske med en

THIS PAGE BLANK (USPTO)

kalibreringskurva och/eller algoritm, som svarar mot flera kalibratorvärden.

Kalibratorn och analyten har ofta varit samma substans. Undantag finnes. Vid antikroppsbestämning har en och samma kalibrator ofta fungerat för flera antikroppsspecificiteter förutsatt att kalibratorsubstansen valts så att den uppvisar en konstant domän av den antikropp som skall bestämmas. Se t.ex. Abbott WO 97/27486.

10 **Nackdelar med tidigare känd teknik**

Tidigare känd teknik har vanligtvis inneburit att man parallellt med prov bestämt flera kalibratorvärden genom att köra kända mängder analyt (standardmängder) på motsvarande sätt som prov. Detta i sin tur har lett till att 5-20% av alla körningar varit kalibratorkörningar. Genom att minska antalet kalibratorkörningar, eventuellt även genom att minska antalet reaktionssteg i varje kalibratorkörning, skulle man spara tid och åtgång av reagens.

Det uppstår ofta problem, som beror på att kalibrator- och provlösningar har olika egenskaper och innehåll. Detta är speciellt uttalat vid immunologiska tester där kalibratorn ofta mäts i buffert och analysen av prov görs på serum- eller plasmaprover. Skillnad i innehåll och viskositet gör att olika svar erhålles (mäts bl.a. som "recovery" och parallellitet). I en flödesmetodik blir dessutom viskositeten extra viktig eftersom den påverkar vandrings-/flödes hastigheten. Denna skillnad kan man kompensera för, men det gör samtidigt systemen mera känsliga för störningar och därmed ökad spridning vid analysen. Andra problem för tester som utnyttjar flöden är att flödena kan variera beroende på fluktuationer i temperatur, fuktighet etc.

De ovannämnda problemen har i viss utsträckning övervunnits genom den assay-metod som beskrivs i EP-A-253,464 och som utnyttjar en testzon och en referenszon på en fast fas.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Uppfinningens mål

Ett första mål med uppfinningen är att förbättra de kalibreringsmetoder som för närvarande används vid tester av det inledningsvis nämnda slaget.

- 5 Ett andra mål med uppfinningen är att förenkla användandet av kalibratorer, främst genom att minska åtgången av reagens som behövs och/eller minska behovet av antalet mätningar för att erhålla kalibratorvärden.

- 10 Ett tredje mål med uppfinningen, speciellt i samband med flödesmetoder, är att möjliggöra compensation för de skillnader som kan finnas mellan kalibrator- och provlösning och mellan körningar utförda vid olika tillfällen och/eller på olika platser.

15 **Uppfinningen**

- Vi har nu insett att dessa mål kan uppnås om kalibratoren är bunden till matrisen innan bestämning av kalibratorvärde påbörjas enligt avsett protokoll. Denna typ av kalibrator kallas fortsättningsvis matriskalibrator. Uppfinningens
- 20 första huvudaspekt är således en metod enligt det inledningsvis nämnda förfarandet och har som kännetecknande drag att kalibratoren, eller en reaktant som kan binda till kalibratoren, har bundits till en matris, som är olöslig i det vätskemedium i vilket bindning av Reaktant* till kalib-
- 25 ratorn sker, innan bestämning av kalibratorvärde påbörjas. Detta innebär att kalibratoren eller kalibratorbindaren vanligtvis bundits till matrisen redan hos tillverkaren så att matriskalibratoren levereras som en färdig komponent i ett kit. Bindningen mellan kalibrator och matris är
- 30 vanligen av annat slag än den man får mellan Analyt' och Reaktant I vid körning av prov.

- Matriskalibrаторer ger stora fördelar, om transport av Reaktant* till kalibratoren sker med hjälp av ett flöde (processflöde) i en så kallad flödesmatris till en zon i
- 35 matrisen, som innehåller matriskalibratoren eller kalibratorbindaren (kalibratorzon, KZ).

När en kalibratorbindare är bunden till matrisen, kan kalibratoren antingen vara rörligt (diffunderbart)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

30 -12- 1998

fördeponerad i matrisen i en zon skild från detektionszonen, eller också kan den tillsättas tillsammans med eller separat från provet.

5 Kalibratorbindaren är vanligtvis den ena komponenten i ett specifikt bindningspar (reaktantpar), varvid den andra komponenten i bindningsparet är kopplad eller konjugerad till kalibratorsubstansen. Sådana specifika bindningspar är välkända för fackmannen och som exempel kan nämnas: immunologiska bindningspar som antigen-antikropp och
10 haptent-antikropp, biotin-avidin eller -streptavidin, lektin-socker, hormon-hormonreceptor, nukleinsyraduplex.

Flödesmatriser

15 Flödesmatrisen definierar det rum i vilket reaktanterna transporteras. Matrisen kan således vara den inre ytan av en enkel flödeskanal (exempelvis en kapillär), den inre ytan av en porös matris med genomgående system av flödeskanaler (porös matris) etc. Denna typ av matriser kallas flödesmatriser. Matriserna kan vara i form av
20 monoliter, ark, kolonner, membraner, enskilda flödeskanaler av kapillära dimensioner eller sammansatta system av dylika flödeskanaler etc. De kan även vara i form av partiklar som packats i kolonnhylsor, sammanpressade fibrer etc. Matrisens inre yta, d.v.s. flödeskanalernas yta, bör vara
25 hydrofil, så att vattenhaltiga medier (främst vatten) kan absorberas och transporteras genom matrisen. Flödeskanalernas minsta innermått (för runda kanaler mått som en diameter) skall vara tillräcklig stort för att tillåta transport genom matrisen av de reaktanter som används.
30 Tumregeln är att lämpliga matriser finns att välja bland de som har flödeskanaler med minsta innermått i intervallet 0,4-1000 µm, med företräde för 0,4-100 µm om matrisen har ett system av sinsemellan kommunicerande flödeskanaler. Flödeskanaler med minsta innermått i den övre delen av det
35 breda intervallet (upp till 1000 µm) är främst aktuella för flöden som drivs av externt pålagt tryck/sug.

Aktuella matriser är ofta uppbyggda av en polymer, exempelvis nitrocellulosa, nylon etc. Materialet i matrisen

THIS PAGE BLANK (USPTO)

30 -12- 1998

såväl som flödeskanalernas fysiska och geometriska utformning kan variera utefter flödet beroende på vad en viss del av matrisen skall utnyttjas till (Pharmacia AB WO 96/22532; Medix WO 94/15215).

- 5 I matrisen kan utefter flödet finnas en eller flera definierade zoner för applicering av prov, reaktanter, buffert etc (A_PZ , A_RZ , A_BZ etc) och en eller flera zoner för kalibrator och/ eller detektion (KZ respektive DZ).

- 10 Olika flödesmatriser, som kan användas i den aktuella typen av tester, finns beskrivna i tidigare patentpublikationer. Se t.ex. Behringwerke US 4,861,711, Unilever WO 88/08534, Abbott US 5,120,643 och 4,740,468, Becton Dickinson EP 284,232 och 4,855,240; Pharmacia AB WO 96/22532.

15

Processflöde

- Flödets riktning är från en appliceringszon för prov och/eller reaktant mot befintliga kalibrator- och detektionszoner (KZ respektive DZ). Exakt vilka zoner
20 processflödet skall passera bestäms av aktuellt testprotokoll. Ett processflöde kan starta från en punkt med radiell spridning och en flödesfront i form av en cirkelperiferi eller del därav. Ett processflöde kan även starta från en zon i form av ett band och ha rak
25 flödesfront vinkelrät mot flödesriktningen.

- I en mindre föredragen variant utgår processflödet från en appliceringszon för Reaktant*, som samtidigt är kalibratorzon eller detektionszon. Flödet sprids i denna variant helst radiellt ut från appliceringszonen och
30 passerar eventuellt ytterligare kalibratorzoner och/eller detektionszoner.

- Flöde genom matriserna kan åstadkommas genom kapillärkrafters inverkan, exempelvis genom att man startar med en i huvudsak torr matris. Som hjälp kan en sugande
35 kropp vara placerad i slutändan av flödet. Med hjälp av ett pålagt elektriskt fält kan lösta komponenter transporteras från appliceringszon till detektions-/kalibratorzon.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

30-12-1998

Flödet, som utnyttjas, är helst lateralt, d.v.s. parallellt med matrisens ovanyta. Även andra typer av flöden, exempelvis djupled i matrisen, kan användas.

5 Kalibrator- och detektionszoner i flödesmatriser

Flödesmatrisen som användes i den föredragna utförandeformen uppvisar en eller flera distinkta zoner med kalibrator (kalibratorzoner, KZ1, KZ2, KZ3 etc). Varje kalibratorzon innehåller matriskalibrator i en mängd, sådan att mätsignalen från Reaktant* (kalibratorvärde), som fångas upp i zonen när flöde passerar, entydigt svarar mot en viss mängd analyt i provet (standardmängd).

Kalibrator kan väljas på samma sätt som man tidigare valt kalibrator för de aktuella typerna av tester. Om man utnyttjar flödesmetodik och arrangerar så att provet (analyten) transporteras genom en kalibratorzon, bör kalibratorn vara vald så att den ej binder till analyten. Om kalibratorn kan binda analyt ställer det speciella krav på kalibratorzonens läge i förhållande till appliceringszonen för prov. Se nedan.

Mängden kalibrator som bundits i en kalibratorzon behöver inte vara densamma, som den standardmängd den svarar mot. Detta beror på att bindningsaktiviteten gentemot Reaktant* ofta förändras, när kalibratorsubstans bindes till en matris.

Vill man bestämma antikroppar med olika specificitet men från samma art, av samma Ig- eller Ig-subklass är det föredraget att kalibratorn uppvisar ett bindningställe som är unikt för arten, klassen, eller subklassen. Detta betyder som regel att en kalibrator för bestämning av antikroppar uppvisar en epitop som finns i en konstant domän av de aktuella antikropparna, för mammalieantikroppar främst en del av Ig(Fc).

En och samma matris kan uppvisa en eller flera detektionszoner (DZ1, DZ2, DZ3 etc) tillsammans med en eller flera kalibratorzoner. I detektionszonen kan komplex innehållande Analyt och Reaktant* bindas till matrisen via den inledningsvis nämnda Fångaren, som är fast förankrad i

THIS PAGE BLANK (USPTO)

en DZ. Om Reaktant I binder till matrisen via Fångaren, behöver Reaktant I från början inte vara immobiliserad i matrisen utan kan antingen vara rörligt (diffunderbart) fördeponerad i matrisen i en area eller zon som är skild från detektionszonen, eller också kan den tillsättas tillsammans med eller separat från provet.

Finns flera kalibrator- och/eller detektionszoner i samma flödesmatris, uppnås de största fördelarna med uppfinningen, om flera av zonerna finns utefter samma processflöde.

Finns flera detektionszoner (DZ1, DZ2, DZ3 etc) i en och samma matris kan dessa svara mot olika analyter. För analyter som har ekvivalenta bindningsställen kan man utnyttja samma kalibrator. Saknar analyterna ekvivalenta bindningsställen fordras en kalibrator för varje analyt. Enklast blir det om alla analyterna har samma ekvivalenta bindningställe. Samma kalibrator, samma kalibratorzoner och samma Reaktant* kan då utnyttjas för alla analyter.

Kalibratorzoner och detektionszoner kan geometriskt vara utformade på olika sätt (rektangulära, cirkulära, linjära, prickformade etc). Relativt varandra kan zonerna ha olika konfiguration. Bra konfigurationer är sådana i vilka ett gemensamt flöde konsekutivt eller samtidigt penetrerar flera zoner, speciellt zoner av olika slag (DZ och KZ).

Exempel på konsekutiv penetration är parallella zoner placerade efter varandra i samma processflöde. Exempel på samtidig penetration är zoner placerade bredvid varandra på samma cirkelperiferi med processflödet radiellt spritt från centrum av motsvarande cirkel. Eventuellt kan kombinationer av dessa varianter användas, d.v.s att det förutom zoner på en cirkelperiferi även finns zoner på periferin av cirklar som är koncentriskt till den först nämnda cirkelperiferin. Samtidig penetration kan även uppnås vid rak flödesfront med detektions- och kalibratorzoner, som ligger bredvid varandra på samma avstånd från processflödets startpunkt.

Om flera detektionszoner- och/eller kalibratorzoner ligger i samma processflöde, kan mätsignal för dessa zoner erhållas i en och samma testkörning/reagensapplicering.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Finns flera kalibratorzoner i samma processflöde kan en dos-responskurva (kalibreringskurva) eller algoritm sättas upp för värden erhållna för samma applicering av Reaktant*. En kalibratorzon som finns tillsammans med en detektionszon i samma flöde kan fungera som en positiv intern kalibrator (PIK).

I en variant utnyttjar man en matris, som uppvisar minst en kalibratorzon (KZ1, KZ2, etc (positiva interna kalibrаторer)) och minst en detektionszon (DZ1, DZ2, etc) i kombination med ett eller flera separat erhållna kalibratorvärden. De separat erhållna kalibratorvärdena behöver inte hänföra sig till samma betingelser, som provet skall köras under. I den mån separata kalibratorvärden, kalibreringskurva och algoritm är avsedda att användas under en längre tid talar man om master-värden, master-kurva respektive master-algoritm.

Användningen av separat erhållna kalibratorvärden innebär att man:

- i. låter prov och Reaktant* passera en detektionszon (DZ) och en positiv intern kalibrator (PIK, KZ) i en matris, som uppvisar både DZ och KZ,
- ii. bestämmer mätsignalen från en KZ (PIK-värde, KZ) och från DZ,
- iii. jämför PIK-värdet med motsvarande separat erhållna kalibratorvärde(n), varvid eventuella avvikelser är ett mått på avvikelser mellan de betingelser, vid vilka provet körts, och de standardbetingelser, som gäller för det/de separata kalibratorvärdet(-ena),
- iv. anpassar den uppmätta signalen för provet (provvärdet) till de betingelser som gäller för de separat erhållna kalibratorvärdena, varefter man
- v. erhåller mängden analyt i provet genom att jämföra den anpassade mätsignalen för provet med det/de separata kalibratorvärdet(-ena).

Alternativt kan man anpassa de separata kalibratorvärdena till avvikelser i betingelser och sedan direkt jämföra uppmätt provvärde med anpassade kalibratorvärden. Detta är

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ekvivalent med stegen (iv) och (v) ovan (kallas vice versa i patentkrav). I stegen (iv) och (v) ingår givetvis att som alternativ anpassa motsvarande kalibreringskurva eller algoritm för att beräkna analytnivån genom att jämföra provvärdet med endera av dem.

Vad som sagts ovan gäller givetvis även för det fall att man bundit en bindare för kalibratorn i matrisens kalibreringszon(er).

Kalibrator- och detektionszon i samma processflöde kommer att minska tidigare felkällor som berott på skillnader i prov och kalibrator. Positiv intern kalibrator och flera kalibratorzoner i samma processflöde kompenserar helt eller delvis för variationer i flöden mellan enskilda körningar. Spridningen i mätresultatet bör kunna bli lägre då såväl interna som externa faktorer kan kompenseras bort helt eller delvis. Problemet med att prov och kalibrator har olika sammansättning undanröjs. För närpatienttester kommer den interna kalibratorn att kunna ge en väl definierad gräns för vad som är ett positivt svar samt ge den kvalitetssäkring, som idag saknas för dessa typer av tester.

Förankringen av kalibratorn till matrisen kan vara via kovalent bindning eller via fysikalisk adsorption, biospecifik affinitet etc. Liksom i tidigare teknik inom området kan uppfinningen utnyttja kombinationer av bindningstyper, exempelvis kovalent bindning till matrisen av en biospecifik affinitetsreaktant riktad mot kalibratorn. Speciellt kan nämnas fysikaliskt adsorberat eller kovalent bundet streptavidin i kombination med biotinylerad kalibrator, eller en på liknande sätt bunden antikropp, som är riktad mot kalibratorn. Förankring av kalibratorn till matrisen kan ske via partiklar som deponerats i/på matrisen och till vilka kalibratorn är kovalent, fysikaliskt adsorptivt eller biospecifikt etc bunden. Partiklarna fäster till matrisen antingen därför att deras storlek valts så att de ej kan transporteras genom matrisen eller också via fysikalisk adsorption. Se bland annat Abbott/Syntex US 4,740,468; Abbott EP 472,376; Hybritech EP 437,287 och EP 200,381; Grace & Co EP 420,053;

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fuji Photo Film US 4,657,739; Boehringer Mannheim WO 94/06012.

Fångaren kan vara bunden till en detektionszon enligt samma principer som för kalibrator. I ett och samma processflöde kan kalibrator och Fångare vara bundna till sina respektive zoner på samma eller olika sätt. Vad som sagts ovan beträffande förankringen av kalibratoren och Fångaren gäller givetvis även förankringen av en bindare för kalibratorsubstansen. T.ex. kan den ovannämnda kombinationen av en biotinylerad kalibratorsubstans och fysikaliskt eller kovalent bundet streptavidin användas.

Appliceringszon för prov (A_pZ)

Appliceringszonen för prov kan ligga uppströms eller nedströms kalibratorzoner, med företräde för uppströms. För det fall att matriskalibratoren är vald, så att den binder analyt måste appliceringszonen för prov ligga nedström matriskalibratoren. Relativt detektionzoner skall appliceringszonen för prov i praktiska utförandeformer alltid ligga uppströms.

I vissa mindre föredragna utförandeformer kan man tänka sig applicering av prov i en kalibrator- eller detektionszon.

25 Appliceringszon för Reaktant* (A_RZ) och andra biospecifika affinitetsreaktanter (A_RZ)

Appliceringszon för Reaktant* (A_RZ) bör alltid ligga uppströms kalibratorzonerna.

Finns detektionszon i processflödet skall ordningen av appliceringszonerna för biospecifika affinitetsreaktanter säkerställa att Analyt transporteras in i sin detektionszon före eller samtidigt med Reaktant*. En eller flera reaktanter kan tillsättas i samma appliceringszon. Om appliceringszonen är gemensam för prov och minst en reaktant, förslagsvis Reaktant*, kan applicering ske samtidigt, t.ex. genom att prov och en reaktant blandats innan de appliceras i zonen. Vid behov kan blandningen

THIS PAGE BLANK (USPTO)

förinkuberas så att reaktanten på avsett sätt binder till analyten eller andra komponenter i provet innan applicering. Fackmannen kan med kunskap om olika protokoll lätt bestämma vilka zoner han behöver och i vilken ordning de kan ligga.

Om Reaktant I är i löst form, har matrisen en appliceringszon för denna samtidigt som det finns en Fångare fast förankrad i detektionszonen. Om Fångaren fordrar ytterligare biospecifika affinitetsreaktanter för att kunna binda Reaktant I (se under rubriken "Teknikområde"), finns appliceringszoner för dessa reaktanter. Appliceringszoner för Reaktant I, när den ej är Fångare, och eventuella ytterligare reaktanter måste vara placerade så att Reaktant I når detektionszonen före eller samtidigt med Analyt'. Om Reaktant I är i löslig form, är Fångaren med fördel den ena komponenten i ett specifikt bindningspar, vars andra komponent är kopplad eller konjugerad till Reaktant I. Exempel på specifika bindningspar är immunologiska bindningspar som antigen-antikropp och haptent-antikropp, biotin-avidin eller -streptavidin, lektin-socker, hormon-hormonreceptor, nukleinsyraduplex.

Om både kalibratoren och Reaktant I är i löslig form för att sedan bindas till matrisen via specifika bindningspar, är givetvis de båda bindningsparen olika.

I vissa mindre föredragna utförandeformer kan biospecifika affinitetsreaktanter (inklusive Reaktant*) appliceras i en kalibrator- eller detektionszon. Jämför under rubriken "Processflöde".

Reaktanter som utnyttjas i metoden kan vara fördeponerade i sin respektive zon eller tillsätts i samband med att bestämningssmetoden utföres. Fördeponering innebär att reaktanten ifråga applicerats i förväg på sådant sätt att den ej sprider sig utanför sin appliceringszon förrän flöde av vätska initieras i eller passerar zonen.

Fördeponering av reaktanter kan ske på i och för sig känt sätt. Se till exempel (Behringwerke US 4,861,711; Unilever WO 88/08534; Abbott US 5,120,643; Becton Dickinson EP

THIS PAGE BLANK (USPTO)

284,232). Det är viktigt att man tar hänsyn till att en fördeponerad reaktant lätt skall gå i lösning när vätska passerar genom den aktuella appliceringszonen. För att uppnå snabb upplösning är det vanligt att man

5 inkorporerar/samdeponerar reaktanter i/med substanser som snabbt går i lösning. Denna typ av substanser är ofta hydrofila med polära och/eller laddade grupper, såsom hydroxi, karboxi, amino, sulfonat etc. Speciellt kan nämnas hydrofila snabblösliga polymerer, exempelvis med kolhydrat-

10 struktur, enkla socker inkluderande mono-, di- och oligo-sackarider och motsvarande sockeralkoholer (mannitol, sorbitol etc). Vanligt är att man först belägger den aktuella appliceringszonen med ett skikt av den snabb-

15 lösliga substansen, varefter reaktanten appliceras, eventuellt följt av ytterligare ett skikt snabblöslig substans. Ett alternativt sätt är att inkorporera reaktanten i partiklar av snabblösligt material som sedan deponeras i aktuell zon av matrisen.

20 Zoner för buffert (A_pZ)

Nödvändiga buffertsystem kan ingå i lösningar som tillsättes samtidigt med prov och reaktanter. Enligt konventionell teknik sker tillsats av buffert i den appliceringszon, som är belägen uppströms alla övriga

25 appliceringszoner. Detta har ofta varit detsamma som provpåsättningszon. I föreliggande uppfinning kan buffert i princip tillsättas i valfri position utefter transportflödet. Se nedan.

I en parallellt inlämnad, PCT-ansökan "Analysförfarande med tillsättning i två eller flera positioner och anordning och testkit för detta" (baserad på SE 9704934-0) beskrivs en uppfinning, som i en variant ger en föredragen utförandeform av föreliggande uppfinning. Denna

30 patentansökan inkorporeras härmed "by reference" i föreliggande text. Uppfinningen i denna separata

35 patentansökan baserar sig på upptäckten, att vätska från två efterföljande zoner (AZ2 och AZ1) i en flödesmatris kan vandra efter varandra utan att blanda sig. Detta uppnås om

THIS PAGE BLANK (USPTO)

man applicerar vätska till den nedströms belägna zonen (AZ1) före eller i huvudsak samtidigt med vätska till den uppströms belägna zonen (AZ2). Denna upptäckt har lett till att man kan uppnå zonvis vandring av eventuella reaktanter, som finns i vätskorna, mot en detektionszon. Placeras appliceringszonen för prov (A_pZ) nedströms appliceringszonen för Reaktant* (A_rZ) och vätska appliceras till A_rZ och provet till A_pZ , kan analyten vandra in i detektionszonen innan vätskan, som innehåller Reaktant*, gör det. Har man en appliceringszon för enbart vätska (buffert) (A_bZ) mellan A_rZ och A_pZ får man en tvätt av detektionszonen DZ mellan uppfångning av analyt och Reaktant*. En dylik mellanliggande buffertzona (A_bZ) kan också säkerställa att en reaktant (inklusive analyt), som är applicerad i en nedströms belägen zon, når DZ före en reaktant, som startar från en uppströms belägen appliceringszon. Detta senare kan vara viktigt om matrisen i sig retarderar reaktanten som applicerats i den nedströms belägna zonen.

Reaktanter kan ingå i den vätska som appliceras till en zon. Alternativt kan de vara fördeponerade i den zon som motsvarande vätska skall appliceras eller i en zon som ligger mellan denna och närmast nedströms liggande zon för applicering av vätska. Prov (analyten) appliceras som regel i form av vätska.

Denna utförandeform av uppfinningen är speciellt intressant för sekventiella metoder av den aktuella typen i flödesmatriser, d.v.s. förfaranden i vilka matrisen förutom kalibratorzon även innehåller detektionszon, och där provet/analyten skall transporteras in i detektionszonen före vätska, som innehåller Reaktant*.

Analytiskt detekterbar reaktant (Reaktant*)

Vanligen erhålles analytisk detekterbarhet för en reaktant genom att den är utrustad med en analytiskt detekterbar grupp. Välkända exempel på ofta använda grupper

THIS PAGE BLANK (USPTO)

är enzymatiskt aktiva grupper (enzym, kofaktor, koenzym, enzymsubstrat etc), fluorofora, kromofora, kemiluminiscenta, radioaktiva grupper etc. Även grupper som påvisas med hjälp av en biospecifik affinitetsreaktant
5 brukar räknas hit, exempelvis biotin, haptent, Ig-klass-, Ig-subklass- och Ig-artspecifika determinanter etc. Speciellt bra i uppfinningen har det visat sig vara med partiklar vars yta belagts med en biospecifik
10 affinitetsreaktant. Partiklarna kan innehålla någon av nyss nämnda detekterbara grupper, såsom fluorofora grupper, eller vara färgade (= innehåller kromogena grupper). Användbara partiklar har ofta en storlek i intervallet 0,001-5 μm med företräde för 0,01-5 μm . Partiklarna kan vara sfäriska och/eller monodispersa eller polydispersa. De kan
15 vara av kolloidala dimensioner, s.k. sol (d.v.s. vanligen sfäriska och monodispersa med storlek i intervallet 0,001-1 μm). Välkända partikulära markörgrupper är metallpartiklar (exempelvis guldsol), icke-metallpartiklar (exempelvis SiO_2 , kol, latex och avdödade erythrocyter och bakterier). I
20 vissa fall har man betonat att partiklarna skall vara icke-sedimenterbara under utnyttjade betingelser (Se Pharmacia AB, WO 96/22532).

Se ytterliggare Unilever, WO 88/08534; Abbott, US 5,120,643; Becton Dickinson, EP 284,232.

25 I samband med utvecklingsarbetet av matriskalibratorer har vi överraskande funnit att bra resultat kan erhållas om man samtidigt utnyttjar:

- (a) Reaktant* där den detekterbara gruppen är partiklar enligt ovan, och
- 30 (b) En detektionszon i vilken Fångaren fäster till matrisen via partiklar (förankringspartiklar), som har dimensioner som skulle tillåta transport av partiklarna genom matrisen.

Vi har uppnått fungerande system där markörpartiklar och
35 förankringspartiklar haft i huvudsak samma dimension vilket innebär att med all sannolikhet kan markörpartiklarna vara större än förankringspartiklarna och vice versa så länge

THIS PAGE BLANK (USPTO)

som de bara är mindre än de flödeskanaler som matrisen definierar. Systemet kan fungera såväl med som utan fördeponering av Reaktant*. Denna utförandeform beskrives närmare i en samtidigt med denna ansökan inlämnad PCT-
5 ansökan "Analysmetod med partiklar och testkit för utförande av metoden" (baserad på SE 9704935-7). Även denna ansökan är inkorporerad "by reference". Applicerat på föreliggande uppfinning innebär detta att Reaktant* har partiklar som analytiskt detekterbar grupp enligt a ovan
10 och att kalibratoren och/eller Fångaren binder till matrisen via partiklar enligt b ovan.

Aktuella testprotokoll

Uppfinningen kan främst appliceras på icke-kompetitiva
15 (icke-inhibition) testvarianter, men även på kompetitiva (inhibition) testvarianter om dessa innebär att ett komplex bildas med en analyt-relaterad reaktant bunden mellan Reaktant I och Reaktant*. Protokollen kan köras som simultana eller sekventiella varianter. Med simultana
20 metoder avses att Reaktant* och Analyt' samtransporteras under minst en del av transporten mot detektionszonen och helst når denna samtidigt. Med sekventiell metod avses att Analyt' under minst en del av transporten mot
25 detektionszonen vandrar före Reaktant* och helst når detektionszonen före Reaktant*. Illustrativa exempel ges nedan. "-" avser fast förankring till matrisen från början. "---" avser bindning via biospecifik affinitet". Det har förutsatts att reaktanterna är monofunktionella med avseende på de bindningsställen som utnyttjas.

30

A. Sandwich-protokoll: Reaktant I (= Fångare) och Reaktant* har biospecifik affinitet mot analyten (= Analyt'). x är antal mol Reaktant I på matrisen. y är antal mol Analyt' (= mol Reaktant*), som fångats upp på matrisen via
35 Reaktant I.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

30 -12- 1998

Bildat komplex:

Matris[-Reaktant I]_{x-y}[-Reaktant I ---Analyt'---
Reaktant*]_y

- 5 B. Sandwich-protokoll: Reaktant II (= Fångare) har biospecifik affinitet mot Reaktant I som i sin tur har biospecifik affinitet mot analyten (= Analyt'). Reaktant* har biospecifik affinitet mot analyten. x är antal mol Reaktant II på matrisen. y är antal mol
- 10 Analyt' (= mol Reaktant*) som fångats upp på matrisen via Reaktant II---Reaktant I. z + y är antal mol Reaktant I som fångats upp på matrisen via Reaktant II. Bildat komplex:

Matris[-Reaktant II]_{x-z-y}[-Reaktant II---Reaktant I]_z[-
15 Reaktant II---Reaktant I---Analyt'---Reaktant*]_y

- C. Protokoll av inhibitionstyp: Reaktant I är analytanalog (= Fångare) och har bindningsställen som är ekvivalenta med bindningsställen på analyten. Analyt' är en reaktant
- 20 som har biospecifik affinitet mot analyten och mot Reaktant I. Reaktant* har biospecifik affinitet mot Analyt'. Analyt' ingår i det bildade komplexet i en mängd som är relaterad till mängden analyt i provet. X är antal mol Reaktant I på matrisen. y är antal mol
- 25 Analyt' (= antal mol Reaktant*), som fångats upp på matrisen via Reaktant I.

Bildat komplex:

Matris[-Reaktant I]_{x-y}[-Reaktant I---Analyt'--- Reaktant*]_y

30 Analyter i prov

- Uppfinningen är främst avpassad för att bestämma biospecifika affinitetsreaktanter (analyter) av de inledningsvis nämnda slagen. Stora fördelar erhålles för analyter som förekommer i multipla former, vilka som
- 35 gemensam nämnare har minst ett bindningsställe med ekvivalenta bindningsegenskaper.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

För icke-kompetitiva metoder (sandwich) kan analyten vara en antikropp riktad mot ett antigen (inklusive allergen) eller haptet (Testprotokoll A och B ovan). Reaktant I är i detta fall antigenet eller haptetet mot vilket antikroppen är riktad, och Reaktant* är en antikropp riktad mot analyten. Alternativt är Reaktant* antigenet eller haptetet, och Reaktant I är antikropp riktad mot analyten. För icke-kompetitiva metoder kan analyten även vara ett antigen, varvid Reaktant* och Reaktant I är antikroppar riktade mot antigenet. Som exempel på analyt-antigen kan nämnas immunglobulin eventuellt av viss Ig-klass eller Ig-subklass. Reaktant* respektive Reaktant I kan, när analyten är en antikropp eller ett immunglobulin, uppvisa biospecifik affinitet mot en Ig-determinant, som är specifik för en Ig-klass, såsom IgA, IgD, IgE, IgG eller IgM, och/eller för en subklass om sådan finns (exempelvis IgG1, IgG2, IgG3 eller IgG4), och/eller för en viss art. Detta innebär att Reaktant* respektive Reaktant I vanligen är en antikropp som uppvisar någon av dessa specificiteter, när analyten är en antikropp eller ett immunglobulin.

Kompetitiva varianter är främst applicerbara på analyter, som är lågmolekylära. I testprotokoll C ovan kan analyten vara ett antigen/haptet varvid Reaktant I är antigenet/haptetet bundet till matrisen, Analyt' är en antikropp riktad mot antigenet/ haptetet, och Reaktant* är en antikropp riktad mot Analyt'.

För uppfinnarna har det varit speciellt intressant att kunna mäta analyter vars förekomst och/eller mängd är relaterad till autoimmun sjukdom och allergi. Speciellt intressant är att mäta anti-allergen-antikroppar av IgE- eller IgG-klass, för de senare gärna med tonvikt på någon av de nämnda subklasserna. Mätning av allergen-specifika antikroppar kan utnyttjas i samband med diagnosticering av IgE-medierad allergi.

35

Prover

Aktuella prover kan vara av biologiskt ursprung exempelvis från olika kroppsvätskor (helblod, serum,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

plasma, saliv, urin, tårvätska, cerebrospinalvätska etc),
extrakt från biologisk vävnad, från cellodlingsmedier,
upparbetningsförfaranden inom bioteknik, från livsmedel,
från miljön (miljöanalysprover) etc. Proverna kan vara
5 förbehandlade för att passa till exempelvis matrisen, test-
protokollet som ingår etc.

En andra aspekt av uppfinningen

Denna aspekt av uppfinningen avser en testanordning där
10 matriskalibratören utgör en central punkt. Matriskalibratören
användes i analysmetoder för att överföra uppmätta
signalvärden (provvärden) för komplexbunden analytiskt
detekterbar reaktant (=Reaktant*) till reala mängder analyt
i ett prov i samband med att man utför en analysmetod som
15 utnyttjar biospecifika affinitetsreaktioner. Liksom i
metodaspekten komplexbindes Reaktant* i en mängd som är
relaterad till mängden analyt i ett prov. Den viktigaste
typen av analysmetoder, som anordningen kan användas för,
är de som uppfinningens metod användes för, d.v.s. metoder
20 vid vilka man bildar komplex som innehåller Reaktant I---
Analyt'---Reaktant*. Reaktant I, Analyt', Reaktant* och ---
har samma betydelse som i metodaspekten.

Anordningen kännetecknas av att den uppvisar:

- a) en flödesmatris, i vilken det finns ett område för
25 processflöde för transport av Reaktant*, och att det
i detta område finns
 - i. en eller flera kalibratorzoner (KZ1, KZ2 etc),
som innehåller en till matrisen fast förankrad
kalibrator eller bindare för kalibratören,
30 varvid mängderna kalibrator respektive kalibra-
torbindare är olika för minst två kalibrator-
zoner och kalibratören uppvisar bindings-
ställen till vilka Reaktant* kan binda, när
Reaktant* transporteras genom en kalibratorzon,
35 samt
 - ii. uppströms nämnda en eller flera kalibratorzoner
en appliceringszon för Reaktant* ($A_R.Z$).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Om kalibratorzonen/zonerna istället för kalibratorn innehåller en bindare för kalibratorsubstans, innehåller anordningen förträdesvis även:

- 5 b) kalibrator som är rörligt (diffunderbart)
fördeponerad i eller nedströms A_pZ .

Företrädesvis ingår anordningen i ett kit som innefattar:

- c) Reaktant*, som eventuellt är fördeponerad i A_RZ .

Processflödet kan även innehålla (a) en detektionszon (DZ), som är belägen nedströms eller sammanfaller med A_RZ
10 och i vilken det finns en fast förankrad Fångare via vilken Reaktant* kan binda till DZ, samt (b) en appliceringszon för prov (A_pZ), som är belägen uppströms eller sammanfaller med nämnda DZ. A_RZ kan ligga uppströms eller nedströms eller sammanfalla med A_pZ (om den finns), med företräde
15 för uppströms eller nedströms. Om A_pZ och DZ finns i samma processflödet som kalibratorzonerna, så ligger A_pZ helst uppströms och DZ helst nedströms befintliga kalibratorzoner.

Den fast förankrade reaktanten (Fångaren) har i
20 föredragna utförandeformer biospecifik affinitet mot analyten eller en analytrelaterad reaktant, som kan vara analytiskt detekterbar. Analytrelaterad reaktant är främst aktuellt för kompetitiva testvarianter.

Kalibratorsubstans väljes på samma sätt som i
25 metodaspekten av uppfinningen. För de fall att vald kalibratorsubstans uppvisar biospecifik affinitet mot analyten skall motsvarande kalibratorzon ligga uppströms A_pZ .

Ytterligare detaljer om kalibratörer, zoner, reaktanter, matriser, processflöden, testprotokoll, prover etc framgår
30 ur beskrivningen för metodaspekten av uppfinningen.

Uppfinningen skall nu åskådliggöras med ett antal exempel som visar olika bästa utförandeformer av densamma.

Uppfinningen definieras av bifogade patentkrav och av det
35 som framgår av beskrivningen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**EXEMPEL 1: BESTÄMNING AV BJÖRKSPECIFIK IGE MED KOLPARTIKELKONJUGAT OCH
MED KALIBRATOR BUNDEN TILL MATRISEN**

Metoder och material

5 Adsorption av fenyl-dextran till polystyrenpartiklar:

Fenyl-dextran (substitutionsgrad: 1 fenylgrupp på var femte monosackaridenhet = 20 %, Mw dextran 40.000, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sverige) adsorberades till polystyrenpartiklar (0.49 µm Bangs Laboratories, USA) genom inkuberingar under omrörning med fenyl-dextran löst i avjoniserat vatten till 1) 5 mg/mL, 10 % partikelsuspension, RT 1 timme; 2) 5 mg/mL, 5% partikelsuspension, RT 1 timme; 3) 20 mg/mL, 1% partikelsuspension, RT över natt 15 timmar. Partiklarna tvättades därefter två gånger med avjoniserat vatten. Partikelsuspensionerna centrifugerades mellan varje inkubering och tvätt (12.100xg, 25 min, Beckman, J-21, JA-20, 10.000 rpm). Partikelsuspensionen sonikerades slutligen (Ultraljudsbad, Branson 5210, 5 min).

20 Koppling av humant IgE (hIgE) till polystyrenpartikel (=

hIgE-partiklar): Humant IgE kopplades till fenyl-dextranbelagda polystyrenpartiklar med CDAP (1-cyano-4-dimetylaminopyridiniumbromid) (Kohn J and Wilchek M, FEBS Letters 154(1) (1983) 209-210).

25 Avsaltning och buffertbyte av hIgE utfördes genom gelfiltrering (PD-10, Pharmacia Biotech AB, Sverige) i NaHCO₃, 0,1 M, pH 8,5. 278 mg polystyrenpartiklar (enligt ovan) i 2% lösning i 30 vol% aceton aktiverades med 4,2 mL CDAP (0,44 M) och 3,4 mL TEA (0,2 M trietylamin, Riedel-de Haen, Tyskland). CDAP tillsattes under omrörning 60 sek och TEA under 120 sek. Partiklarna tvättades med 30 vol% aceton och centrifugerades vid 12.100xg (25 min, Beckman, J-21, JA-20, 10.000 rpm). 25 mg hIgE kopplades till de aktiverade partiklarna vid inkubering under omrörning över natt vid 30 +4°C. Därefter centrifugerades partiklarna innan
35 avaktivering skedde med glutaminsyra 0,05 M och asparginsyra 0,05 M i NaHCO₃-buffert. Inkubering utfördes sedan under omrörning över natt vid +4°C. Kopplade partik-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

30 -12- 1998

lar tvättades med 0,1 M NaHCO_3 och två gånger med 20 mM boratbuffert pH 8,5. Partikelkoncentration bestämdes spektrofotometriskt vid $A_{600 \text{ nm}}$ med obehandlade partiklar som referens. Kopplad proteinkoncentration bestämdes genom att ha radioaktivt humant IgE närvarande vid kopplingen.

10 Extraktion av t3 (björkpollen, Betula verrucosa): 1 del (vikt) björkpollen (Allergon, Sverige) extraherades med 10 delar (volym) 0,1 M fosfatbuffert (benämnes 1/10), pH 7,4. Extraktionen pågick i 2 timmar på skakbord vid + 4°C. Extraktet centrifugerades vid 4000 rpm i 1,75 timmar. Efter filtrering applicerades lösningen på PD-10-kolonn och eluerades ut i 0,1 M NaHCO_3 , pH 8,5 (benämnes 1/14).

15 Koppling av t3-extrakt till polystyrenpartikel (t3-partiklar): t3 extrakt (1/14) kopplades med CDAP (Kohn and Wilchek, FEBS Letters 154(1) (1983) 209-210) till polystyrenpartiklar belagda med fenyl-dextran. Polystyrenpartiklar (400 mg, belagda med fenyl-dextran enligt ovan) i 30 vol-% aceton, 2 % partikelsuspension, aktiverades med 60 mg CDAP (100 mg/mL i 30 % aceton) och 0,48 mL 0,2 M trietylamin (Riedel-de Haen, Tyskland). CDAP tillfördes under omrörning och TEA tillfördes dropptvis under 90 sekunder och omrörning i totalt 120 s. Reaktionen avbröts genom tillsats av 30 % aceton (4 ggr vol) och centrifugering vid 12.400xg i 35 min. Partiklarna tvättades 1 gång med avjoniserat vatten. 32 mL t3-extrakt i 0,1 NaHCO_3 , pH 8,5 tillfördes 80 mg av de aktiverade partiklarna och koppling pågick i 1 timme på skakbord. 20 Därefter centrifugerades partiklarna innan de avaktiverades med 0,05 M asparaginsyra och 0,05 M glutaminsyra i 0,1 NaHCO_3 , pH 8,5. Inkubering på skakbord över natt vid + 4°C. Partiklarna tvättades, genom centrifugering, i 1) 0,1 M NaHCO_3 , 0,3 M NaCl, pH 8,5; 2) 0,1 M Na-acetat, 0,3 M NaCl, pH 5; 3) 0,1 M NaHCO_3 , pH 8,5; och 4) 20 mM Na-borat, pH 8,5. 35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Partikelkoncentrationen bestämdes spektrofotometriskt vid 600 nm med obelagda polystyrenpartiklar som referens.

Adsorption av anti-human-IgE-antikropp till kolpartiklar

5 (kolpartikelkonjugat = Reaktant*): Monoklonal anti-hIgE adsorberades till kolpartiklar (sp100 från Degussa, Tyskland). Se Pharmacia AB, WO 96/22532. Den färdiga suspensionen var spädd med buffert till 400 µg kolpartiklar per ml.

10 Deponering av t3-partiklar på membran i detektionszon: På

nitrocellulosaflak med polyesterbaksida (Whatman, 8 µm, 5 cm bred) applicerades 4 % av ovan t3-kopplade partiklar med Linear Striper (IVEK Corporation) med flödet 1 µL/s och 1
15 µL/cm som en rak zon. Flaken torkades 1 timme, 30°C, varefter flaken klipptes vinkelrät mot zonen till 0,5 cm breda remsor (Matrix 1201 Membrane Cutter, Kinematics Automation).

20 Deponering av hIgE-partiklar i kalibratorzoner: På nitro-

cellulosaflak med polyesterbaksida (Whatman, 8 µm, 5 cm bredd) deponerades som parallella kalibratorzoner hIgE-partiklar med Linear Striper (IVEK Corporation, USA).

Flödet var 1 µL/sek och 1 µL/cm. Flak avsedda för remsor
25 med enbart kalibratorzoner belades med sex stycken parallella zoner. hIgE-koncentrationerna i zonerna var 0; 0,84; 3,4; 14; 54,2 och 217 ng hIgE/0,5 cm. Innan

deponeringen utfördes späddes hIgE-partiklarna i borat-
30 buffert (20 mM, pH 8,5, dextran T5000 4,2 %w/w, sorbitol 5,8 %w/w). I samtliga zoner ingick även 1%

fenyldextranbelagda partiklar för att ge samma mängd partiklar i varje zon. På separat nitrocellulosaflak

deponerades en zon med hIgE-partiklar (14 ng hIgE/0,5 cm, PIK = positiv internkalibrator) och i en parallell zon t3-

35 partiklar enligt ovan (detektionszon). Deponeringen skedde med samma parametrar som för hIgE-partiklar. Flaken torkades 1 timme vid 30°C, varefter de klipptes, vinkelrätt mot

THIS PAGE BLANK (USPTO)

zonerna, till remsor på 0,5 cm bredd (Singulator: Matrix 1201 membrane cutter, Kinematic automation, USA)

Testförfarande: Remsor monterades på en plan plastyta.

- 5 Upptill (0,5 cm) på remsan placerades ett sugande membran (bredd 3 cm, Whatman, 17 Chr). För konstant tryck lades metalltyngder på de sugande membranen. Tio mm från nederkanten monterades en 2 mm bred Inplastor-remsa (förklitrad polyesterfilm). Inplastor-remsan skall hindra
- 10 att applicerade vätskor flyter ut över för stor del av membranet. Till nederkanten av remsan applicerades 30 µl prov alternativt buffert. Efter insugning av provvolymen sattes i tur och ordning: 15 µL buffert, 15 µL kolpartikelkonjugat enligt ovan och 30+30 µL buffert.
- 15 Bufferten var: NaPO_4 0,1 M, BSA 3%, NaN_3 0,05 %, sukros 3 %, NaCl 0,5 %, fenyl-dextran 0,25 %, bovint gammaglobulin 0,05 %, pH 7,5. Reaktionszonernas svärtningsgrad mättes som absorbans med ultroskan (ultroskan XL, Enhanced Laser Densitometer, LKB).

20

Resultat

A) Aktivitetsbestämning på deponerad IgE-kalibratorkurva mot IgE-kalibratorer (24°C) körda som prov på enskilda remsor med anti-hIgE antikropp i bindningszon.

25

Tabell 1:

	Deponerad mängd IgE	Beräknad KU/L	Abs (x1000) *
1	0,84	0,27	46
30 2	3,4	0,48	109
3	14	0,71	266
			används nedan som positiv intern kalibrator
35 4	54,2	2,7	619
5	217	66,3	1882

THIS PAGE BLANK (USPTO)

*= absorbans på reaktionszon efter att kolpartikel-konjugat har bundit in.

- 5 B) Bestämning av björkspecifik IgE-antikropp i patientprover körda vid 18, 24 och 37°C, med och utan positiv internkalibrator (PIK) för att justera standardkurvan (körd vid 24°C).

10 **Tabell 2:** Resultat (KU/L) med och utan korrigerad kalibratorkurva:

	Korrigerad			Ej Korrigerad		
	18°C	24°C	37°C	18°C	24°C	37°C
Prov 1	1,3	1,1	1,4	0,83	1,1	1,8
Prov 2	6,9	5,5	6,7	5,1	8,6	20

15

Resultaten visar att det går att kompensera för variationen i de enskilda körningarna genom att använda positiva internkalibratorer. Dessutom visar resultaten att det är möjligt att använda sig av fördeponerade kalibratorer.

20 Den i detta exempel visade utförandeformen kan modifieras så att man uppfyller ett eller flera av följande kriterier:
 (a) har fördeponerad Reaktant* i en appliceringszon och/eller (b) har appliceringszon för prov belägen nerströms eller uppströms appliceringszon för Reaktant*,
 25 (c) har zoner som tillåter samtidig tillsättning av Reaktant* och prov.

30 **EXEMPEL 2: BESTÄMNING AV BJÖRKSPECIFIKT IgE MED FLUORESCENTA DETEKTIONSPARTIKLAR OCH MED KALIBRATOR FÖRDEPONERAD I APPLICERINGSZON**

Metoder och material

35 Koppling av streptavidin till polystyrenpartiklar:
 Streptavidin (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sverige) kopplades kovalent till fenyl-dextranadsorberade polystyrenpartiklar med CDAP (1-cyano-4-dimetylamino-pyridiniumbromid) (Kohn J and Wilchek M, FEBS Letters 154

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(1) (1983) 209-210), enligt beskrivningen i Exempel 1 ovan för hIgE. De kopplade partiklarna tvättades tre gånger med 50 mM NaPO₄, 0,05% NaN₃, pH 7,4. Partikelkoncentrationen bestämdes spektrofotometriskt vid A600 nm med obehandlade partiklar som referens.

Deponering av streptavidin-kopplade partiklar på

nitrocellulosamembran: På nitrocellulosafлак med polyesterbaksida (Whatman, 8 µm, 5 cm bred) applicerades zoner med Linear Striper (IVEK Corporation) av:

1) streptavidinkopplade partiklar spädda till 1 % partikelhalt i 10 mM NaPO₄, 5 % sukros, 5% dextran T5000, 0,01 % NaN₃, pH 7,4;

2) t3-kopplade partiklar, framtagna enligt Exempel 1, spädda till 4% partikelhalt i 50 mM NaPO₄, 10 % sukros, 0,05 % NaN₃, pH 7,4. Deponeringsflödet var 2,5 µL/cm och hastigheten 20 mm/sek.

Deponeringarna torkades 1 timme vid 30°C, och flaken klipptes till 0,5 cm breda remsor (Matrix 1201 Membrane Cutter, Kinematics Automation).

Koppling av anti-hIgE-antikroppar till

detektionspartiklar: Antikroppar mot hIgE klyvda med pepsin till fab'2-fragment kopplades till fluorescenta

polystyrenpartiklar med aldehydgrupper på ytan (Molecular Probes C-17177 TransFluoSpheres, aldehyde-sulfate microspheres, 0,1 µm, 633/720, 2 % solids). 23 mg antikropp kopplades sedan till 66 mg partiklar i 50 mM NaPO₄-buffert, pH 6,5, över natt i rumstemperatur, varefter 205 µL NaCNBH₄

(5 M) tillsattes för att reducera kopplingen under 3 timmar i rumstemperatur. Centrifugering utfördes vid 20.800 x g (50 min i Eppendorf 5417R 14 000 rpm), och avaktivering i glutaminsyra 0,05 M och asparaginsyra 0,05 M i avjoniserat vatten pH 6,5 skedde sedan över natt under omrörning i

rumstemperatur. Därefter centrifugerade man vid 20.800 x g i 50 min, varefter blockering utfördes med 0,2 % BSA i 50 mM NaPO₄, pH 7,4, med 0,05 % NaN₃, och man inkuberade över

THIS PAGE BLANK (USPTO)

natt vid +4°C. Man centrifugerade sedan på nytt vid 20.800 x g i 50 min och tvättade två gånger med blockeringsbuffert som sedan också användes för förvaring. Partikelkoncentration bestämdes i fluorimeter (Perkin-Elmer LS50B) med standardkurva gjord av ursprungspartikeln. Kopplad proteinkoncentration bestämdes genom att ha radioaktivt anti-hIgE närvarande vid kopplingen.

Biotinylering av hIgE: Biotinylering av hIgE utfördes enligt rekommenderade betingelser från leverantören (Pierce). hIgE avsaltades genom gelfiltrering med PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech AB) i 0,15 M KPO₄, 0,15 M NaCl, pH 7,8. Till 0,95 mL (0,59 mg) hIgE tillsattes 0,010 mL biotin-LC-Sulfo-NHS (3,59 mM, Pierce). Inkubering skedde sedan vid rumstemperatur 1 timme, varefter kopplingsreaktionen avbröts genom tillsats av 40 µL 2 M glycin. Blandningen applicerades därefter på gelfiltreringskolonn PD-10 jämviktad med 50 mM NaPO₄, 0,15 M NaCl, pH 7,4. Utbyten och final koncentration beräknades utifrån radioaktivitet då I-125-inmärkt hIgE ingick vid kopplingen. Koncentrationen av hIgE analyserades med immunkromatografi och UniCAP tIgE (Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Sverige).

Deponering av biotinylerat IgE på appliceringsfilter:
Till appliceringsfilter 5x5 mm (Whatman F075-14) dispenserades 0,006 mL biotinylerat IgE (1,6 ng) spätt i 50 mM NaPO₄, 0,15 M NaCl, 6% BSA, 5% laktos, 5% dextran T5000, pH 7,4. Filtren torkades vid 30°C i 1 timme.

Testförfarande: Remsor monterades på en yta som lutade ca 16° från bänkplanet. Sugande membran (3,4 cm bred, Schleicher & Schuell, GB004) placerades 0,5 cm in på remsans övre kant. För konstant tryck lades metalltyngder på de sugande membranen. Prover och reagens pipetterades sedan i ordning enligt nedan. Varje prov och reagensvolym fick suga in i membranet innan nästföljande volym pipetterades.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 1) 30 μ L 50 mM NaPO_4 , 0,15 M NaCl, pH 7,4.
- 2) Filter med fördeponerat biotinylerat IgE placerades längst ned på remsan.
- 3) 30 μ L patientserum pipetterades till varje filter.
- 5 4) 20 μ L testbuffert (0,1 M Na- PO_4 , 0,15 M NaCl, 10 % sukros, 3 % BSA, 0,05 % bovint gammaglobulin, 0,05 % NaN_3 , pH 7,4) tillsattes filtret.
- 5) Appliceringsfiltret avlägsnades.
- 6) 20 μ L detektionskonjugat (75 μ g/ml) spätt i testbuffert.
- 10 7) 2 x 30 μ L testbuffert.
- 8) Detektionszonens fluorescens mättes som responsyta (Vmm) med en scannande röd laser-fluorometer (635 nm).

Tre stycken positiva t3-serum valdes och analyserades i triplikat med tre olika konjugatbatcher. Som lagrad kalibreringskurva användes signalytor erhållna med
15 nitrocellulosa belagd med olika IgE-partikelkoncentrationer (beskrivet i Exempel 1 ovan) körd med konjugat 2.

PIK-korrigerigering innebar att signalen för reaktionszonen för t3 multiplicerades med PIKexp/PIKobs före avläsning mot
20 lagrad kalibreringskurva (masterkurva). PIKexp definierades som medelvärde för PIK-signalerna erhållna vid körningen med konjugat 2.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Resultat

Avläsning mot Masterkurva
vid **okorrigerad signal**

Serum	Konc (KU/L)	Medel av 3-plikat		Mellan CV(%)
	Konjugat 1	Konjugat 2	Konjugat 3	
1	0.75	3.0	1.4	68
2	5.7	29.1	18.7	66
3	2.5	10.8	6.8	62

5

Avläsning mot Masterkurva
vid **PIK-korrigerad signal**

Serum	Konc (KU/L)	Medel av 3-plikat		Mellan CV(%)
	Konjugat 1	Konjugat 2	Konjugat 3	
1	2.5	3.5	1.9	29
2	14.2	19.5	20.7	19
3	3.6	5.3	6.1	26

- 10 Mellan CV(%) är beräknad som spridningen för de tre erhållna medelvärdena för de olika konjugaten. Resultaten visar att idén med fördeponerad kalibratorssubstans i appliceringszonen fungerar och att dess användning som en PIK dessutom ger en minskad mellan-assay-spridning.

15

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENTKRAV

1. Sätt vid metod för bestämning av en analyt i ett prov
som innebär att man utnyttjar biospecifika
5 affinitetsreaktioner och att följande steg ingår:
 - i. man bildar ett komplex som innehåller:
Reaktant I---Analyt'---Reaktant*, där
 - a. Reaktant* och Reaktant I uppvisar biospecifik
affinitet mot analyten,
 - 10 b. Reaktant* är analytiskt detekterbar,
 - c. Analyt' är analyten eller en analytrelaterad
reaktant, varefter
 - ii. man bestämmer den detekterbara signalen från
Reaktant* i komplexet (provvärde), och
 - 15 iii. man erhåller mängden analyt i provet genom att
jämföra provvärdet med ett eller flera kalibrator-
värden som vart och ett svarar mot en
standardmängd analyt,

kännetecknat av att man innan bestämning av
20 kalibratorvärde har bundit antingen (i) kalibratoren
eller (ii) en bindare för kalibratoren till en matris,
varvid man, när en bindare för kalibratoren bundits till
matrisen, vid bestämningen av kalibratorvärde
tillsätter kalibrator eller lösliggör kalibrator som
25 fördeponerats i matrisen, och att matrisen är olöslig i
det vätskemedium i vilket bindning av Reaktant* till
kalibratoren sker.
2. Sätt enligt krav 1, **kännetecknat** av att man innan
30 bestämning av kalibratorvärde har bundit kalibrator
till matrisen.
3. Sätt enligt krav 1, **kännetecknat** av att man innan
bestämning av kalibratorvärde har bundit bindare för
35 kalibrator till matrisen.
4. Sätt enligt krav 1 eller 3, **kännetecknat** av att nämnda
bindare för kalibratoren är ena komponenten i ett

THIS PAGE BLANK (USPTO)

specifikt bindningspar, medan den andra komponenten i det specifika bindningsparet är kopplad eller konjugerad till kalibratorn.

- 5 5. Sätt enligt något av kraven 1-4, **kännetecknat** av att kalibratorn och analyten har förmåga att biospecifikt binda till Reaktant* via ekvivalenta bindningsställena.
- 10 6. Sätt enligt något av kraven 1-5, **kännetecknat** av
- a. att matrisen är en flödesmatris som uppvisar en eller flera kalibratorzoner (KZ1, KZ2, KZ3 etc),
- 15 b. att (i) varje kalibratorzon innehåller kalibrator i en mängd som svarar mot en standardmängd analyt, eller (ii) varje kalibratorzon innehåller kalibratorbindare, varvid mängden kalibratorbindare och mängden kalibrator svarar mot en standardmängd analyt, och
- 20 c. att man binder Reaktant* till kalibratorn genom att låta Reaktant* transporteras genom kalibratorzonerna.
- 25 7. Sätt enligt krav 6, **kännetecknat** av att flödesmatrisen är en lateral flödesmatris.
8. Sätt enligt krav 6 eller 7, **kännetecknat** av
- a. att två eller flera av zonerna KZ1, KZ2, KZ3 etc med kalibrator eller bindare för kalibrator ligger i samma processflöde, varvid minst två av
- 30 zonerna svarar mot olika standardmängd analyt, och
- b. att transport av Reaktant* för bindning till matriskalibrator i de olika KZ sker via detta processflöde.
- 35 9. Sätt enligt krav 6 eller 7, **kännetecknat** av
- a. att enskilda kalibratorzoner (KZ) ligger i separata processflöden, och
- b. att transport av Reaktant* för bindning till

THIS PAGE BLANK (USPTO)

kalibrator i en kalibratorzon KZ sker via
respektive processflöde.

10. Sätt enligt något av kraven 8 eller 9, **kännetecknat** av
- 5 a. att processflödet respektive processflödena
saknar detektionszon, och
- b. att man bildar komplexet i en detektionszon i ett
processflöde, som saknar kalibratorzon och som finns
i en matris av samma slag som kalibratorzonerna.
- 10 11. Sätt enligt något av kraven 1-5, **kännetecknat** av att
matrisen är en flödesmatris och att det utefter ett och
samma processflöde finns
- 15 a. en eller flera kalibratorzoner (KZ), var och en
uppvisande en matriskalibrator eller matris-
kalibratorbindare,
- b. en eller flera detektionszoner, av vilka ingen
sammanfaller med någon kalibratorzon och i vilka
en Fångare är fast förankrad och är antingen
- 20 Reaktant I eller biospecifik affinitetsreaktant som
direkt eller indirekt kan binda Reaktant I biospeci-
fikt, och
- c. en appliceringszon för Reaktant*, $A_R.Z$, vilken
ligger uppströms nämnda KZ och DZ och till vilken
- 25 Reaktant* kan ha fördeponerats,
- d. en appliceringszon för prov ($A_P.Z$) vilken ligger
- i. uppströms eller sammanfaller med en detektions-
zon,
- 30 ii. nedströms eller uppströms eller sammanfaller
med $A_R.Z$ ($A_P.Z/A_R.Z$), eller
- iii. ligger uppströms, nedströms eller sammanfaller,
med en kalibratorzon,
- med företräde för att appliceringszonen för prov
($A_P.Z$) ligger uppströms både detektions- och
- 35 kalibratorzoner, och

THIS PAGE BLANK (USPTO)

30 -12- 1998

- att man tillsätter Reaktant* till $A_R \cdot Z$, om Reaktant* ej är fördeponerad, eller buffert till $A_R \cdot Z$ om Reaktant* är fördeponerad, och prov till $A_p \cdot Z$, eventuellt förblandat med Reaktant* om $A_p \cdot Z$ och $A_R \cdot Z$ sammanfaller, så att analyt och Reaktant* når DZ samtidigt eller att analyt når DZ före Reaktant*.
12. Sätt enligt krav 11, **kännetecknat** av att kalibratorzonen eller -zonerna (KZ) uppvisar kalibratorbindare, och att kalibrator är fördeponerad uppströms kalibratorzonen eller -zonerna.
13. Sätt enligt krav 11 eller 12, **kännetecknat** av att processflödet innehåller två eller flera av nämnda kalibratorzoner.
14. Sätt enligt krav 11 eller 12, **kännetecknat** av att processflödet innehåller en eller två av nämnda kalibratorzoner och att man erhåller nivån analyt i provet genom att:
- a. man har tillgång till ett eller flera separat erhållna kalibratorvärden, och
 - b. man jämför ett kalibratorvärde för en kalibratorzon (Positiv Intern Kalibrator = PIK), som ligger i samma processflöde som nämnda detektionszon, med ett eller flera av de separat erhållna kalibratorvärdena,
 - c. man anpassar mätsignalen från detektionszonen till hur mätsignalen för PIK avviker från de separata kalibratorvärdena, varefter
 - d. man erhåller analytnivån i provet genom att den anpassade mätsignalen från detektionszonen jämföres med ett eller flera av de separat erhållna kalibratorvärdena,
- eller vice versa med avseende på vad som anpassas och jämföres i stegen c och d.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15. Sätt enligt något av kraven 11-14, **kännetecknat** av
- a. att A_pZ är (i) gemensam med $A_{R*}Z$ ($= A_pZ/A_{R*}Z$) eller (ii) ligger uppströms $A_{R*}Z$, och
 - b. att för alternativ (i) prov är förblandat med Reaktant* innan det sättes till den gemensamma zonen $A_pZ/A_{R*}Z$, eller prov sättes till den gemensamma zonen $A_pZ/A_{R*}Z$, som innehåller fördeponerad Reaktant*, och för alternativ (ii) prov sättes till A_pZ , som ligger uppströms $A_{R*}Z$ som i sin tur innehåller fördeponerad Reaktant*.
16. Sätt enligt något av kraven 6-15, **kännetecknat** av att Reaktant*, som analytiskt detekterbar grupp har partiklar, och/ eller att kalibrator eller kalibratorbindare och/eller Fångare, om detektionszon finns, är förankrad till matrisen via partiklar.
17. Sätt enligt något av kraven 1-16, **kännetecknat** av att analyten är en antikropp riktad mot Reaktant I eller mot Reaktant*, varvid
- a. Reaktant* är en antikropp riktad mot analyten och Reaktant I är ett antigen/hapten, när analyten är en antikropp riktad mot Reaktant I, och
 - b. Reaktant* är ett antigen eller ett haptent och Reaktant I en antikropp riktad mot analyten, när analyten är en antikropp riktad mot Reaktant*.
18. Sätt enligt något av kraven 1-16, **kännetecknat** av att analyten är ett antigen, och Reaktant* och Reaktant I är antikroppar riktade mot analyten.
19. Sätt enligt något av kraven 1-18, **kännetecknat** av att man utför metoden som en del i diagnosticering av allergi eller autoimmun sjukdom.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

30 -12- 1998

20. Anordning för att överföra uppmätta signalvärden för komplexbunden analytiskt detekterbar reaktant (=Reaktant*) till reala mängder analyt i ett prov i samband med att man utför en analysmetod, vilken utnyttjar biospecifika affinitetsreaktioner för att bestämma
5 mängd analyt i ett prov för att bilda komplex innehållande Reaktant* i en mängd som är relaterad till mängden analyt i provet, **kännetecknad** av att anordningen uppvisar:
- 10 en flödesmatris, i vilken det finns ett område för processflöde för transport av Reaktant*, och att det i detta område finns
- i. en eller flera kalibratorzoner (KZ1, KZ2 etc), som innehåller en till matrisen fast förankrad kalibrator eller bindare för kalibrator, varvid
15 mängderna av kalibrator respektive kalibratorbindare är olika för minst två kalibratorzoner och kalibratorn uppvisar bindningsställen till vilka Reaktant* kan binda, när Reaktant*
20 transporteras genom en kalibratorzon, samt
- ii. uppströms nämnda en eller flera kalibratorzoner en appliceringszon för Reaktant* ($A_R.Z$).
21. Anordning enligt krav 20, **kännetecknad** av att
25 kalibratorbindare är fast förankrad i matrisen och anordningen innefattar kalibrator fördeponerad uppströms kalibratorzonen, till exempel i $A_p.Z$.
22. Anordning enligt krav 20 eller 21, **kännetecknad** av att
30 den innefattar Reaktant* fördeponerad i $A_R.Z$.
23. Anordning enligt krav 20, 21 eller 22, **kännetecknad** av att processflödet innehåller en detektionszon (DZ), som är belägen nedströms eller sammanfallande med $A_R.Z$ och
35 innehåller en fast förankrad Fångare via vilken Reaktant* kan binda till DZ, samt en appliceringszon

THIS PAGE BLANK (USPTO)

för prov (A_pZ), som är belägen uppströms eller sammanfaller med nämnda DZ.

24. Anordning enligt krav 23, **kännetecknad** av att A_rZ
5 ligger uppströms eller nedströms eller sammanfaller
med A_pZ , med företräde för uppströms eller nedströms.
25. Anordning enligt något av kraven 23-24, **kännetecknad** av
att den fast förankrade reaktanten (Fångaren) har
10 biospecifik affinitet mot analyten eller en
analytrelaterad reaktant.
26. Anordning enligt något av kraven 23-24, **kännetecknad** av
att den fast förankrade reaktanten (Fångaren) har
15 biospecifik affinitet mot en andra reaktant som i sin
tur har biospecifik affinitet mot analyten eller en
analytrelaterad reaktant.
27. Anordning enligt något av kraven 23-26, **kännetecknad** av
20 att nämnda en eller flera kalibratorzoner ligger
uppströms DZ.
28. Anordning enligt något av kraven 23-27, **kännetecknad** av
att A_pZ ligger uppströms alla kalibratorzoner.
25
29. Testkit, **kännetecknat** av att det innefattar en
anordning enligt något av kraven 20-28.
30. Kit enligt krav 29, **kännetecknat** av att det innefattar
30 Reaktant*.
31. Kit enligt krav 29 eller 30, **kännetecknat** av att det
innefattar kalibrator när nämnda anordning har
kalibratorbindare bunden till matrisen.
35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SAMMANDRAG

Vid en metod för bestämning av en analyt i ett prov som innebär att man utnyttjar biospecifika affinitetsreaktioner och där följande steg ingår:

- 5 i. 'man bildar ett komplex som innehåller:
Reaktant I---Analyt'---Reaktant*, där
 - a. Reaktant* och Reaktant I uppvisar biospecifik affinitet mot analyten,
 - 10 b. Reaktant* är analytiskt detekterbar,
 - c. Analyt' är analyten eller en analytrelaterad reaktant, varefter
 - 15 ii. man bestämmer den detekterbara signalen från Reaktant* i komplexet (provvärde), och
 - 15 iii. man erhåller mängden analyt i provet genom att jämföra provvärdet med ett eller flera kalibratorvärden som vart och ett svarar mot en standardmängd analyt,
- har man före bestämning av kalibratorvärde bundit antingen
- 20 (i) kalibratoren eller (ii) en bindare för kalibratoren till en matris som är olöslig i det vätskemedium i vilket bindning av Reaktant* till kalibratoren sker, varvid man, när en bindare för kalibratoren bundits till matrisen, vid bestämningen av kalibratorvärde tillsätter kalibrator eller
 - 25 lösliggör kalibrator som fördeponerats i matrisen.
- Uppfinningen avser även en anordning och ett kit för att utföra metoden.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : G01N 33/53	A1	(11) International Publication Number: WO 99/36777 (43) International Publication Date: 22 July 1999 (22.07.99)
(21) International Application Number: PCT/SE98/02464 (22) International Filing Date: 30 December 1998 (30.12.98) (30) Priority Data: 9704933-2 30 December 1997 (30.12.97) SE (71) Applicant (for all designated States except US): PHARMACIA & UPJOHN DIAGNOSTICS AB [SE/SE]; S-751 82 Upp- sala (SE). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): MENDEL-HARTVIG, Ib [SE/SE]; Rabeniusvägen 28, S-756 55 Uppsala (SE). GUSTAFSSON, Jörgen [SE/SE]; Tunagatan 7 D, S-753 37 Uppsala (SE). (74) Agents: WIDÉN, Björn et al.; Pharmacia & Upjohn AB, Patent Dept., S-751 82 Uppsala (SE).		(81) Designated States: AU, CA, JP, US, European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published <i>With international search report.</i> <i>In English translation (filed in Swedish).</i>
(54) Title: METHOD USING A NEW CALIBRATOR AND A DEVICE AND TEST KIT INCLUDING THE CALIBRATOR (57) Abstract <p>In a method for the determination of an analyte in a sample involving utilizing biospecific affinity reactions, and comprising the following steps: i) forming a complex comprising: Reactant I—Analyte'—Reactant*, where a) Reactant* and Reactant I exhibit biospecific affinity to the analyte, b) Reactant* is analytically detectable, c) Analyte' is the analyte or an analyte related reactant, and subsequently ii) determining the detectable signal from Reactant* in the complex (sample value), and iii) obtaining the amount of analyte in the sample by comparing the sample value with one or more calibrator values, each of which corresponds to a standard amount of analyte, either (i) the calibrator or (ii) a binder for the calibrator has been bound before the determination of the calibrator value to a matrix which is insoluble in the liquid medium in which binding of Reactant* to the calibrator occurs, wherein, when a binder for the calibrator has been bound to the matrix, calibrator is added or calibrator pre-deposited in the matrix is released at the determination of calibrator value. The invention also relates to a device and a test kit for performing the method.</p>		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece			TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon			PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

METHOD USING A NEW CALIBRATOR AND A DEVICE AND TEST KIT
INCLUDING THE CALIBRATOR

Technical field

- 5 The invention relates to a method associated with a process for the determination of an analyte in a sample, which process involves utilizing biospecific affinity reactions. The method includes the steps of:
- 10 i. forming a complex containing:
Reactant I---Analyte'---Reactant*, where
 - a. Reactant* and Reactant I exhibit biospecific affinity to Analyte', and
 - b. Reactant* is analytically detectable, subsequently
 - 15 ii. determining the detectable signal from Reactant* in the complex (sample value), and
 - iii. obtaining the amount of analyte in the sample by comparing the sample value with corresponding signal(s) (calibrator value(s)) from Reactant*,
20 which has separately been allowed to bind to one or more amounts of a calibrator (calibrator amounts), each one of which corresponding to a known amount of analyte (standard amount(s)).
- 25 Analyte' is the analyte as such (in the sample) or an analyte related reactant, i.e. an added biospecific affinity reactant, included in the complex in an amount which is related to the amount of analyte in the sample. Reactant* and Reactant I can bind Analyte' at the same time. This means
30 that they bind to spatially separated binding sites.

This type of analytical methods has been carried out i.a. in so-called flow matrices, whereby reactants including analyte are transported in a process flow through the matrix (= flow

methodology) to a detection zone (DZ) where Reactant* is captured in an amount related to the amount of analyte in the sample. Capture occurs via a reactant (Capturer) which is firmly anchored to the matrix in DZ. The Capturer may be
5 Reactant I or a reactant which has biospecific affinity to Reactant I or to another reactant, which in turn, optionally via one or more additional reactants, has biospecific affinity to Reactant I.

10 By reactants (including analyte) exhibiting biospecific affinity (bioaffine reactants) is meant individual members of the reactant pairs: antigen/hapten - antibody; biotin - avidin/streptavidin; two complementary single chains of nucleic acid etc. As antibodies, antigen binding antibody
15 fragments such as Fab, F(ab)₂', single chain Fv antibodies (scFv) etc. are considered. The reactants in question need not be naturally occurring but can also be synthetically prepared molecules/binders.

20 The type of test methods in question has previously been used primarily for biospecific affinity reactants where at least one part of an employed reactant pair has exhibited protein structure, in particular in connection with so-called immuno-chemical determination procedures.

25 The biospecific affinity reactions are primarily performed in aqueous media (such as water).

Previously used calibrators

30 Conventionally, the calibrator and analyte have often both been able to bind to Reactant*. The binding sites in question on the calibrator for binding to Reactant* often have binding properties equivalent to corresponding binding sites on the analyte. In practice this means that the calibrator and the
35 analyte have had binding sites which are structurally equal

or similar, and cross-react with each other with respect to Reactant*. Binding sites which cross-react with each other for/about a given reactant are equivalent.

5 Calibrator amount has in the prior art commonly been equated with standard amount.

Calibrator values, corresponding to different analyte amounts/concentrations (standard amounts), have often been
10 compiled to a dose-response curve (calibration curve) or an algorithm.

The expression "to compare a sample value with calibrator value(s)" has also encompassed that the comparison may take
15 place with a calibration curve and/or algorithm, corresponding to several calibrator values.

The calibrator and the analyte have often been the same substance. There are exceptions. In antibody determination
20 one and the same calibrator has often been operational for several antibody specificities, provided that the calibrator substance has been selected such that it exhibits a constant domain of the antibody to be determined. See for example Abbott WO 97/27486.

25

Disadvantages of the prior art

The prior art has usually involved determination of several calibrator values in parallel with samples by running known amounts of analyte (standard amounts) in a way corresponding
30 to samples. This has in turn led to 5-20% of all runs having been calibrator runs. By reducing the number of calibrator runs, possibly also by reducing the number of reaction steps in each calibrator run, time and consumption of reagent could be saved.

35

Often problems occur depending on calibrator and sample solutions having different properties and contents. This is particularly pronounced in immunological tests where the calibrator often is measured in a buffer, and the analysis of sample is performed on serum or plasma samples. A difference in contents and viscosity yields different responses (i.a. measured as "recovery" and parallelity). In addition the viscosity in a flow method becomes extra important since it influences the migration/flow velocity. This difference can be compensated for but at the same time it renders the systems more sensitive to disturbances, and thus increased inter assay variation. Other problems with tests utilizing flows are possible flow variations depending on temperature and moisture fluctuations etc.

15

The above problems have to some extent been overcome by the assay method disclosed in EP-A-253,464 and which uses a test zone and a reference zone on a solid phase.

20 Object of the invention

A first object of the invention is to improve the calibration methods presently used in tests of the kind initially mentioned.

25 Another object of the invention is to simplify the use of calibrators, primarily by reducing the necessary consumption of reagents needed and/or reducing the number of measurements for obtaining calibrator values.

30 A third object of the invention, in particular in connection with flow methods, is to enable compensation for the differences that may exist between calibrator and sample solution and between runs performed at different times and/or at different places.

35

The invention

We have now realized that these objects can be achieved if the calibrator is bound to the matrix before beginning the determination of calibrator value in accordance with a
5 relevant protocol. This type of calibrator will be referred to below as a matrix calibrator. The first main aspect of the invention is therefore a method in accordance with the procedure mentioned initially, and which has the characterizing feature that the calibrator, or a reactant
10 capable of binding to the calibrator, has been bound to a matrix which is insoluble in the liquid medium in which binding of Reactant* to the calibrator occurs, before beginning the determination of a calibrator value. This means that the calibrator or the calibrator binder, respectively,
15 usually has been bound to the matrix already by the manufacturer, such that the matrix calibrator is delivered as a ready component in a kit. The binding between calibrator and matrix normally is of another kind than that obtained between Analyte' and Reactant I when running a sample.

20 Matrix calibrators provide great advantages, if transport of Reactant* to the calibrator occurs by means of a flow (process flow) in a so-called flow matrix to a zone in the matrix, which contains the matrix calibrator or the
25 calibrator binder (calibrator zone, CZ).

When a calibrator binder is bound to the matrix, the calibrator may be either movably (diffusively) pre-deposited in the matrix in a zone separated from the detection zone, or
30 it may be added together with or separately from the sample.

The calibrator binder is usually one member of a specific binding pair (reactant pair), the other member of the binding pair being coupled or conjugated to the calibrator substance.
35 Such specific binding pairs are well-known to a person

skilled in the art, and as examples may be mentioned:
immunological binding pairs, such as antigen-antibody and
haptan antibody, biotin-avidin or -streptavidin,
lectin-sugar, hormone-hormone receptor, nucleic acid duplex.

5

Flow matrices

The flow matrix defines the space in which the reactants are transported. Thus, the matrix may be the inner surface of a single flow channel (such as a capillary), the inner surface
10 of a porous matrix having a system of flow channels (porous matrix) etc. extending through. This type of matrices is called flow matrices. The matrices may exist in the form of monoliths, sheets, columns, membranes, single flow channels having capillary dimensions, or aggregated systems of such
15 flow channels etc. They may also exist in the form of particles packed in column casings, compressed fibers etc. The inner surface of the matrix, i.e. the surface of the flow channels, should be hydrophilic, such that aqueous media (primarily water) may be absorbed and transported through the
20 matrix. The minimum inner dimension of the flow channels (measured as a diameter for channels having a circular cross section) should be sufficiently large for allowing transport through the matrix of the reactants being used. The rule of thumb is that suitable matrices are selectable among those
25 having flow channels with the smallest inner dimension in the interval 0.4-1000 μm , preferably 0.4-100 μm if the matrix has a system of mutually communicating flow channels. Flow channels having a smallest inner dimension in the upper part of the broad interval (up to 1000 μm) are primarily of
30 interest for flows driven by an externally imposed pressure/suction.

Matrices of interest are often built up from a polymer, e.g. nitrocellulose, nylon etc. The material in the matrix as well
35 as the physical and geometrical design of the flow channels

may vary along the flow, depending on what a certain part of the matrix is to be used for (Pharmacia AB WO 96/22532; Medix WO 94/15215).

- 5 Along the flow in the matrix there may be one or more defined zones for application of sample, reactants, buffer etc. (A_SZ , A_RZ , A_BZ etc.), and one or more zones for calibrator and/or detection (CZ and DZ, respectively).
- 10 Various flow matrices that may be used in the type of tests in question are described in previous patent publications. See e.g. Behringwerke US 4,861,711, Unilever 88/08534, Abbott US 5,120,643 and 4,740,468, Becton Dickinson EP 284,232 and 4,855,240; Pharmacia AB WO 96/22532.

15

Process flow

- The direction of the flow is from a zone of application of sample and/or reactant and towards existing calibrator and detection zones (CZ and DZ, respectively). Precisely which
- 20 zones the process flow is to pass is determined by the test protocol in question. A process flow may start from a point with a radial spread and a flow front in the form of a circular periphery or a part thereof. A process flow may also start from a zone in the form of a band and may have a
- 25 straight flow front perpendicular to the direction of flow.

- In a less preferred variant, the process flow proceeds from an application zone for Reactant*, which at the same time is a calibrator zone or a detection zone. In this variant the
- 30 flow is preferably radially spread from the zone of application, and may pass additional calibrator zones and/or detection zones.

- Flow through the matrices may be achieved by influence from
- 35 capillary forces, e.g. by starting off with a substantially

dry matrix. A sucking body may be placed at the very end of the flow as an aid. By means of an imposed electrical field, dissolved components may be transported from the zone of application to a detection/calibrator zone.

5

The utilized flow is preferably lateral, i.e. parallel with the upper surface of the matrix. Also other types of flows, such as in depth in the matrix, may be used.

10 **Calibrator and detection zones in flow matrices**

The flow matrix used in the preferred embodiment exhibits one or more distinct zones with calibrator (calibrator zones, CZ1, CZ2, CZ3 etc.). Each calibrator zone contains matrix calibrator in an amount such that the measurement signal from
15 Reactant* (calibrator value), detected in the zone when a flow passes, distinctly corresponds to a certain amount of analyte in the sample (standard amount).

The calibrator may be selected in the same way as previously
20 was the case for the types of tests in question. Using flow methodology and arranging for sample (the analyte) to be transported through a calibrator zone, the calibrator should be selected such that it does not bind to the analyte. If the calibrator is able to bind analyte it imposes special
25 requirements on the position of the calibrator zone in relation to the zone of application of sample. See below.

The amount of calibrator that has bound to a calibrator zone does not need to be the same as the corresponding standard
30 amount. This is because the binding activity in relation to Reactant* often is changed, when the calibrator substance is bound to a matrix.

If it is desirable to determine antibodies with different
35 specificity but from the same species, of the same Ig class

or Ig subclass, it is preferred that the calibrator exhibits a binding site which is unique for the species, the class, or subclass. As a rule this means that a calibrator for determination of antibodies exhibits an epitope which is
5 present in a constant domain of the antibodies in question, for mammal antibodies primarily a part of Ig(Fc).

One and the same matrix may exhibit one or more detection zones (DZ1, DZ2, DZ3 etc.) together with one or more
10 calibrator zones. In the detection zone, complexes containing Analyte' and Reactant* bind to the matrix via the initially mentioned Capturer, which is firmly fixed in a DZ. If Reactant I binds to the matrix via the Capturer, Reactant I need not be immobilized in the matrix from the start but may
15 either be movably (diffusively) pre-deposited in the matrix in an area or zone separated from the detection zone, or it may be added together with or separately from the sample.

If there are several calibrator and/or detection zones in the
20 same flow matrix, the greatest advantages with the invention are achieved if several of the zones are located along the same process flow.

If there are several detection zones (DZ1, DZ2, DZ3 etc.) in
25 one and the same matrix, these may correspond to different analytes. One can utilize the same calibrator for analytes having equivalent binding sites. If the analytes lack equivalent binding sites one calibrator is required for each analyte. If all analytes have the same equivalent binding
30 site the simplest condition will be at hand. The same calibrator, the same calibrator zones and the same Reactant* may then be utilized for all analytes.

Calibrator zones and detection zones may be geometrically
35 designed in various manners (rectangular, circular, linear,

dot-shaped etc.). The zones may have different configurations relative to each other. Good configurations are such wherein a common flow consecutively or simultaneously penetrates several zones, in particular zones of different kinds (DZ and 5 CZ). An example of consecutive penetration is parallel zones located after each other in the same process flow. An example of simultaneous penetration is zones located next to each other on the same circular periphery, where the process flow is radially spread from the centre of the corresponding 10 circle. Combinations of these variants may be used, i.e. apart from zones on a circular periphery there are also zones on the periphery of circles which are concentric with the first-mentioned circular periphery. Simultaneous penetration may also be achieved with a straight flow front having 15 detection and calibrator zones located next to each other at the same distance from the starting point of the process flow.

If several detection zones and/or calibrator zones are 20 located in the same process flow, a measurement signal for these zones may be obtained in one and the same test run/reagent application. If there are several calibrator zones in the same process flow, a dose-response curve (calibration curve) or algorithm may be set up for the values 25 obtained for the same application of Reactant*. A calibrator zone that exists together with a detection zone in the same flow may function as a positive internal calibrator (PIC).

In one variant a matrix is utilized exhibiting at least one 30 calibrator zone (CZ1, CZ2, etc. (positive internal calibrators)) and at least one detection zone (DZ1, DZ2, etc.) in combination with one or more separately obtained calibrator values. The separately obtained calibrator values need not refer to the same conditions under which the sample is to be 35 run. To the extent separate calibrator values, calibration

curve and algorithm are intended to be used during a longer period of time, reference is made to master values, master curve and master algorithm, respectively.

- 5 The use of separately obtained calibrator values involves:
- i. letting sample and Reactant* pass a detection zone (DZ) and a positive internal calibrator (PIC, CZ) in a matrix exhibiting both DZ and CZ,
 - 10 ii. determining the measurement signal from a CZ (PIC value, CZ) and from DZ,
 - 15 iii. comparing the PIC value with corresponding separately obtained calibrator value(s), whereby any deviations are a measure of deviations between the conditions under which the sample has been run, and the standard conditions applying to the separate calibrator value(s),
 - iv. adapting the measured signal for the sample (sample value) to the conditions applicable for the separately obtained calibrator values, and then
 - 20 v. obtaining the amount of analyte in the sample by comparing the adapted measurement signal for the sample with the separate calibrator value(s).

Alternatively, one may adapt the separate calibrator values
25 to deviations in conditions and then directly compare a measured sample value with adapted calibrator values. This is equivalent to the steps (iv) and (v) above (called vice versa in claims). In the steps (iv) and (v) it is, of course, included as an alternative to adapt the corresponding
30 calibration curve or algorithm in order to calculate the level of analyte by comparing the sample value with either of these.

What has been said above, applies, of course, also to the case that a binder for the calibrator has been bound to the calibration zone(s) of the matrix.

- 5 A calibrator and detection zone in the same process flow will reduce previous sources of error having been caused by differences in sample and calibrator. A positive internal calibrator and several calibrator zones in the same process flow will completely or partly compensate for variations in
- 10 flows between separate runs. The spread in the measurement result should be lower while internal as well as external factors may be compensated for completely or partly. The problem with sample and calibrator having different compositions is eliminated. For near patient tests, the
- 15 internal calibrator will be able to provide a well defined limit as to what constitutes a positive response, and to provide the quality assurance which today is missing for these types of tests.
- 20 The anchoring of the calibrator to the matrix may take place via covalent bonding or via physical adsorption, biospecific affinity etc. Like prior art in this field the invention may utilize combinations of binding types, such as covalent bonding to the matrix of a biospecific affinity reactant
- 25 directed to the calibrator. Specifically, physically adsorbed or covalently bonded streptavidin in combination with a biotinylated calibrator may be mentioned, or a similarly bound antibody directed to the calibrator. Anchoring of the calibrator to the matrix may take place via particles having
- 30 been deposited in/on the matrix, and to which the calibrator is covalently, physically adsorptively or biospecifically etc. bound. The particles attach to the matrix either because their size has been selected such that they cannot be transported through the matrix, or via physical adsorption.
- 35 See i.a. Abbott/Syntex US 4,740,468; Abbott EP 472,376;

Hybritech EP 437,287 and EP 200,381; Grace & Co EP 420,053; Fuji Photo Film US 4,657,739; Boehringer Mannheim WO 94/06012.

5 The Capturer may be bound to a detection zone according to the same principles as those applying to a calibrator. In one and the same process flow a calibrator and Capturer may be bound to their respective zones in the same way or in different ways. What has been said above concerning the
10 anchoring of the calibrator and the Capturer, is, of course, also applicable to the anchoring of a binder for the calibrator substance. For example, the above mentioned combination of a biotinylated calibrator substance and physically or covalently bound streptavidin may be used.

15

Zone of application of sample ($A_S Z$)

The zone of application of sample may be located upstream or downstream in relation to calibrator zones, preferably upstream. In case the matrix calibrator has been selected
20 such that it binds analyte, the zone of application of sample must be located downstream of the matrix calibrator. In relation to detection zones the zone of application of sample should always be located upstream in useful embodiments.

25 In certain less preferred embodiments it is conceivable to apply sample in a calibrator or detection zone.

Zone of application of Reactant* ($A_{R*} Z$) and other biospecific affinity reactants ($A_R Z$)

30 An application zone for Reactant* ($A_{R*} Z$) should always be located upstream of the calibrator zones.

If there is a detection zone in the process flow, the order of the zones of application of biospecific affinity reactants

should ensure that Analyte' is transported into its detection zone before or simultaneously with Reactant*. One or more reactants may be added in the same zone of application. If the zone of application is common to sample and at least one
5 reactant, let us say Reactant*, application may occur simultaneously, e.g. by having mixed a sample and a reactant before they are applied in the zone. If desired, the mixture may be preincubated such that the reactant will bind to the analyte or to other components in the sample, as intended,
10 before application of the sample. Having knowledge of various protocols, the skilled person will be able to easily determine which zones he needs and the possible order thereof.

15 If Reactant I is present in dissolved form, the matrix has a zone of application for it at the same time as there is a Capturer firmly fixed in the detection zone. If the Capturer requires additional biospecific affinity reactants in order to bind Reactant I (see under "Technical field"), there are
20 zones of application for these reactants. Zones of application for Reactant I, when it is not a Capturer, and any additional reactants must be positioned such that Reactant I reaches the detection zone before or at the same time as Analyte'. If Reactant I is in soluble form, the
25 Capturer may preferably be one member of a specific binding pair, the other member of which is coupled or conjugated to Reactant I. Exemplary specific binding pairs are immunological binding pairs, such as antigen-antibody and haptan-antibody, biotin-avidin or -streptavidin, lectin-
30 sugar, hormone-hormone receptor, nucleic acid duplex.

If both the calibrator and Reactant I are in soluble form to then bind to the matrix via specific binding pairs, these two binding pairs are, of course, different.

In certain less preferred embodiments biospecific affinity reactants (inclusive Reactant*) may be applied in a calibrator or detection zone. See under the heading "Process flow".

5

Reactants utilized in the method may be predeposited in their respective zone or may be added in connection with performing the method of determination. Predepositing involves application of the reactant in question in advance in such a way that it will not spread outside its zone of application until a flow of liquid is initiated in or passes the zone.

Predeposition of reactants may take place by methods known per se. See for example (Behringwerke US 4,861,711; Unilever
15 WO 88/08534; Abbott US 5,120,643; Becton Dickinson EP 284,232). It is important to take into consideration the fact that a predeposited reactant should easily dissolve when liquid passes through the zone of application in question. In order to achieve quick dissolution it is common to
20 incorporate/codeposit reactants in/with substances that quickly dissolve. This type of substances are often hydrophilic having polar and/or charged groups, such as hydroxy, carboxy, amino, sulphonate etc. In particular there may be mentioned hydrophilic quickly soluble polymers, e.g.
25 having carbohydrate structure, simple sugars including mono-, di- and oligosaccharides and corresponding sugar alcohols (mannitol, sorbitol etc.). It is common practice to first coat the zone of application in question with a layer of the quickly soluble substance, whereupon the reactant is applied,
30 possibly followed by one additional layer of quickly soluble substance. An alternative way is by incorporating the reactant in particles of quickly soluble material, which then is deposited in the zone in question of the matrix.

Zones for buffer (A_BZ)

Buffer systems that are required may be included in solutions added simultaneously with samples and reactants. In conventional techniques addition of buffer takes place in the zone of application that is located upstream of all other zones of application. This has often been equal to the sample application zone. In the present invention buffer may in principle be added in an optional position along the flow of transport. See below.

10 In a co-pending PCT application "Analytical method comprising addition in two or more positions and a device and test kit therefor" (based on SE 9704934-0) there is disclosed an invention, which in one variant provides a preferred
15 embodiment of the present invention. This application is hereby incorporated by reference in the present text. The invention in this separate patent application is based on the discovery that liquid from two subsequent zones ($AZ2$ and $AZ1$) in a flow matrix may migrate after each other without mixing.
20 This will be achieved if liquid is applied to the zone ($AZ1$) located downstream before or essentially simultaneously with application of liquid to the zone ($AZ2$) located upstream. This discovery has led to the ability to achieve zonewise migration of any reactants present in the liquids, towards a
25 detection zone. If the zone of application of sample (A_SZ) is located downstream of the zone of application of Reactant* ($A_{R*}Z$), and if liquid is applied to $A_{R*}Z$ and sample to A_SZ , the analyte may migrate into the detection zone before the liquid containing Reactant* does. If there is one zone of
30 application for liquid alone (buffer) (A_BZ) between $A_{R*}Z$ and A_SZ , a wash of the detection zone DZ is obtained between capture of analyte and Reactant*. Such an intermediate buffer zone (A_BZ) may also ensure that a reactant (including analyte), that is applied in a zone located downstream,

reaches DZ before a reactant, starting from a zone of application located upstream. The latter may be important if the matrix as such retards the reactant that has been applied in the zone located downstream.

5

Reactants may be included in the liquid that is applied to a zone. Alternatively they may be pre-deposited in the zone where the corresponding liquid is to be applied, or in a zone that is located between this and the nearest zone that is
10 located downstream, for application of liquid. Sample (the analyte) normally is applied in the form of liquid.

This embodiment of the invention is particularly interesting for sequential methods of the type in question in flow
15 matrices, i.e. methods wherein the matrix in addition to a calibrator zone also contains a detection zone, and where the sample/analyte is to be transported into the detection zone before liquid containing Reactant*.

20 Analytically detectable reactant (Reactant*)

Usually analytical detectability of a reactant is obtained because it comprises an analytically detectable group. Well-known examples of often used groups are enzymatically active groups (enzyme, cofactor, coenzyme, enzyme substrate etc.),
25 fluorophore, chromophore, chemiluminescent, radioactive groups etc. Groups being detected by means of a biospecific affinity reactant are also usually referred to this category, e.g. biotin, hapten, Ig-class, Ig-subclass and Ig-species specific determinants etc. In the invention, particles the
30 surfaces of which have been coated with a biospecific affinity reactant have proved to be particularly good. The particles may contain any of the previously mentioned detectable groups, such as fluorophore groups, or they may be coloured (= containing chromogenic groups). Useful particles
35 often have a size in the interval 0.001-5 μm , preferably

0.01-5 μm . The particles may be spherical and/or monodisperse or polydisperse. They may have colloidal dimensions, so-called sol (i.e. usually spherical and monodisperse having a size in the interval 0.001-1 μm). Well-known particulate label groups are metal particles (such as gold sol), non-metal particles (such as SiO_2 , carbon, latex and killed erythrocytes and bacteria). In certain cases it has been emphasized that the particles should be non-sedimentable under the utilized conditions. (See Pharmacia AB, WO 96/22532).

See also Unilever, WO 88/08534; Abbott, US 5,120,643; Becton Dickinson, EP 284,232.

15 In connection with the development of matrix calibrators we have surprisingly found that good results may be obtained if one simultaneously utilizes:

- (a) Reactant* where the detectable group is particles as disclosed above, and
- 20 (b) a detection zone in which the Capturer attaches to the matrix via particles (anchoring particles), having dimensions that would allow transport of the particles through the matrix.

25 We have achieved a functioning system wherein label particles and anchoring particles have had substantially the same dimensions, which means that in all probability the label particles may be larger than the anchoring particles and vice versa, as long as they remain smaller than the flow channels defined by the matrix. The system may function with as well as without predeposition of Reactant*. This embodiment is described in more detail in a co-pending PCT-application "Analytical method using particles and test kit for performing the method" (based on SE 9704935-7). Also this latter application is incorporated by reference. Applied to

35

the present invention this means that Reactant* has particles as an analytically detectable group according to a above, and that the calibrator and/or the Capturer binds to the matrix via particles according to b above.

5

Relevant test protocols

The invention may primarily be applied to non-competitive (non-inhibition) test variants, but also to competitive (inhibition) test variants, if these involve that a complex
 10 is formed with an analyte-related reactant bound between Reactant I and Reactant*. The protocols may be run as simultaneous or sequential variants. By simultaneous methods is meant that Reactant* and Analyte' are co-transported during at least a part of the transport towards the detection
 15 zone, and preferably reach the latter simultaneously. By sequential method is meant that Analyte' during at least a part of the transport towards the detection zone migrates in front of Reactant*, and preferably reaches the detection zone before Reactant*. Illustrative examples are given below. "-"
 20 relates to firm anchoring to the matrix from the start. "---" relates to binding via biospecific affinity. It has been assumed that the reactants are monofunctional with regard to the binding sites being utilized.

25 A. Sandwich protocol: Reactant I (= Capturer) and Reactant* have biospecific affinity to the analyte (= Analyte'). x is the number of moles of Reactant I on the matrix. y is the number of moles of Analyte' (= moles of Reactant*) that has been captured on the matrix via Reactant I.

30

Formed complex:

Matrix[-Reactant I]_x-y[-Reactant I---Analyte'---Reactant*]_y

B. Sandwich protocol: Reactant II (= Capturer) has

biospecific affinity to Reactant I, which in turn has biospecific affinity to the analyte (= Analyte').

Reactant* has biospecific affinity to the analyte. x is the number of moles of Reactant II on the matrix. y is the number of moles of Analyte' (= moles of Reactant*) that has been captured on the matrix via

5 Reactant II---Reactant I. z + y is the number of moles of Reactant I that has been captured on the matrix via Reactant II.

Formed complex:

Matrix[-Reactant II]_{x-z-y}[-Reactant II---Reactant I]_{z-}
 10 [-Reactant II---Reactant I---Analyte'---Reactant*]_y

C. Protocol of inhibition type: Reactant I is an analyte

analogue (= Capturer) and has binding sites that are equivalent with the binding sites on the analyte.

15 Analyte' is a reactant that has biospecific affinity to the analyte and to Reactant I. Reactant* has biospecific affinity to Analyte'. Analyte' is included in the formed complex in an amount that is related to the amount of analyte in the sample. x is the number of moles of

20 Reactant I on the matrix. y is the number of moles of Analyte' (= number of moles of Reactant*) that has been captured on the matrix via Reactant I.

Formed complex:

Matrix[-Reactant I]_{x-y}[-Reactant I---Analyte'---Reactant*]_y

25 Analytes in sample

The invention is primarily adapted for determination of biospecific affinity reactants (analytes) of the types mentioned initially. Great advantages are obtained for analytes

30 occurring in multiple forms, which have as a common denominator at least one binding site with equivalent binding properties.

For non-competitive methods (sandwich) the analyte may be an antibody directed to an antigen (including allergen), or hapten (Test protocols A and B above). Reactant I in this case is the antigen or the hapten to which the antibody is directed, and Reactant* is an antibody directed to the analyte. Alternatively Reactant* is the antigen or the hapten, and Reactant I is an antibody directed to the analyte. For non-competitive methods the analyte may also be an antigen, Reactant* and Reactant I being antibodies directed to the antigen. As examples of analyte-antigen may be mentioned immunoglobulin, possibly of a particular Ig class or Ig subclass. When the analyte is an antibody or an immunoglobulin, Reactant* and Reactant I, respectively, may exhibit biospecific affinity towards an Ig determinant that is specific for an Ig class such as IgA, IgD, IgE, IgG or IgM and/or for a subclass if present (e.g. IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4), and/or for a certain species. This means that Reactant* and Reactant I, respectively, normally is an antibody exhibiting some of these specificities when the analyte is an antibody or an immunoglobulin.

Competitive variants are primarily applicable to low molecular analytes. In the test protocol C above the analyte may be an antigen/hapten, in which case Reactant I is the antigen/hapten bound to the matrix, Analyte' is an antibody directed to the antigen/hapten, and Reactant* is an antibody directed to Analyte'.

It has been particularly interesting for the inventors to be able to measure analytes the occurrence and/or amount of which being related to autoimmune diseases and allergy. It is particularly interesting to measure anti-allergen antibodies of IgE or IgG class, for the latter preferably with emphasis on some of the mentioned subclasses. Measurement of allergen

specific antibodies may be employed in connection with diagnosing of IgE mediated allergy.

Samples

5 Relevant samples may be of biological origin, e.g. from different body fluids (whole blood, serum, plasma, saliva, urine, tear liquid, cerebrospinal fluid etc.), extracts from biological tissue, from cell culture media, processing procedures in biotechnology, from foodstuff, from the
10 environment (environmental analysis samples) etc. The samples may be pretreated in order to fit e.g. the matrix, the test protocol involved etc.

A second aspect of the invention

15 This aspect of the invention relates to a test device where the matrix calibrator constitutes a central point. The matrix calibrator is used in analytical methods for transferring measured signal values (sample values) for a complexed, analytically detectable reactant (= Reactant*) to real
20 amounts of analyte in a sample, in connection with performing an analytical method utilizing biospecific affinity reactions. As in the method aspect Reactant* is complexed in an amount that is related to the amount of analyte in a sample. The most important type of analytical methods for
25 which the device may be used are those for which the method of the invention is used, that is methods where one forms complexes comprising Reactant I---Analyte'---Reactant*. Reactant I, Analyte', Reactant* and --- have the same meanings as in the method aspect.

30

The device is characterized by exhibiting:

- a) a flow matrix in which there is an area of process flow for transport of Reactant*, and in that this area comprises

- i. one or more calibrator zones (CZ1, CZ2 etc.) comprising a calibrator, or a binder for the calibrator, that is firmly anchored to the matrix, the amounts of calibrator or calibrator binder, respectively, being different for at least two calibrator zones, and the calibrator exhibiting binding sites to which Reactant* may bind, when Reactant* is transported through a calibrator zone, and
- ii. an application zone for Reactant* (A_R*Z) located upstream of said one or more calibrator zones.

If the calibrator zone/zones instead of the calibrator contains a binder for calibrator substance, the device preferably also contains:

- b) calibrator which is movably (diffusively) pre-deposited in or downstream of A_SZ .

Preferably, the device is included in a kit which comprises:

- c) Reactant* which may be predeposited in A_R*Z .

20

The process flow may also contain (a) a detection zone (DZ) located downstream or coinciding with A_R*Z , and in which there is a firmly fixed Capturer via which Reactant* may bind to DZ, and (b) a zone of application for sample (A_SZ) located upstream or coinciding with said DZ. A_R*Z may be located upstream or downstream or coincide with A_SZ (if present), preferably upstream or downstream. If A_SZ and DZ are present in the same process flow as the calibrator zones, A_SZ is preferably located upstream and DZ preferably downstream of existing calibrator zones.

In preferred embodiments the firmly anchored reactant (Capturer) has biospecific affinity to the analyte or to an

analyte-related reactant that may be analytically detectable. Analyte related reactant is primarily relevant to competitive test variants.

5 Calibrator substance is selected in the same way as in the method aspect of the invention. In those cases where the selected calibrator substance exhibits biospecific affinity to the analyte, the corresponding calibrator zone shall be located upstream of A_{S2} .

10

Additional details regarding calibrators, zones, reactants, matrices, process flows, test protocols, samples etc. are apparent from the description of the method aspect of the invention.

15

The invention will now be illustrated with a number of examples showing various preferred embodiments thereof. The invention is defined by the attached claims and what is disclosed in the description.

20

EXAMPLE 1: DETERMINATION OF BIRCH SPECIFIC IgE WITH CARBON PARTICLE CONJUGATE AND WITH CALIBRATOR BOUND TO THE MATRIX

25 **Methods and materials**

Adsorption of phenyldextran to polystyrene particles:

Phenyldextran (degree of substitution: 1 phenyl group on each fifth monosaccharide unit = 20%, Mw dextran 40,000, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) was adsorbed to polystyrene
30 particles (0.49 μ m Bangs Laboratories, USA) by incubations under stirring with phenyldextran dissolved in deionized water to 1) 5 mg/ml, 10% particle suspension, RT 1 h, 2) 5 mg/ml, 5% particle suspension, RT 1 h, 3) 20 mg/ml, 1% particle suspension, RT overnight 15 h. The particles were
35 subsequently washed twice with deionized water. The particle

suspensions were centrifuged between each incubation and wash (12,100xg, 25 min, Beckman, J-21, JA-20, 10,000 rpm). The particle suspension was finally sonicated (Ultrasonic bath, Branson 5210, 5 min).

5

Coupling of human IgE (hIgE) to polystyrene particle (= hIgE particles): Human IgE was coupled to phenyldextran coated polystyrene particles with CDAP (1-cyano-4-dimethylamino-pyridinium bromide (Kohn J and Wilchek M, FEBS Letters 10 154(1), (1983) 209-210).

Desalting and change of buffer of hIgE were performed by gel filtration (PD-10, Pharmacia Biotech AB, Sweden) in NaHCO_3 , 0.1 M, pH 8.5. 278 mg of polystyrene particles (as above) in 15 2% solution in 30% (by volume) acetone were activated with 4.2 ml CDAP (0.44 M) and 3.4 ml TEA (0.2 M triethylamine, Riedel-de Haen, Germany). CDAP was added during stirring for 60 s and TEA during 120 s. The particles were washed with 30% (by volume) acetone and centrifuged at 12,100xg (25 min, 20 Beckman, J-21, JA-20, 10,000 rpm). 25 mg of hIgE were coupled to the activated particles in incubation with stirring overnight at +4°C. Then the particles were centrifuged before deactivating with glutamic acid 0.05 M and aspartic acid 0.05 M in NaHCO_3 buffer. Incubation was performed with stirring 25 overnight at +4°C. Coupled particles were washed with 0.1 M NaHCO_3 and twice with 20 mM borate buffer pH 8.5. The particle concentration was determined spectrophotometrically at A_{600} nm with untreated particles as reference. Concentration of coupled protein was determined by having 30 radioactive human IgE present during coupling.

Extraction of t3 (birch pollen, *Betula verrucosa*): 1 part (weight) of birch pollen (Allergon, Sweden) was extracted with 10 parts (volume) 0.1 M of phosphate buffer (denoted

1/10), pH 7.4. The extraction lasted for 2 hours on a shaker table at +4°C. The extract was centrifuged at 4000 rpm for 1.75 h. After filtering the solution was applied to a PD-10 column and eluted in 0.1 M NaHCO₃, pH 8.5 (denoted 1/14).

5

Coupling of t3 extract to a polystyrene particle (t3

particles): t3 extract (1/14) was coupled with CDAP (Kohn and Wilchek, FEBS Letters 154(1) (1983) 209-210) to polystyrene particles coated with phenyldextran. Polystyrene particles

10 (400 mg, coated with phenyldextran as above) in 30% (by volume) acetone, 2% particle suspension, were activated with 60 mg of CDAP (100 mg/ml in 30% acetone) and 0.48 ml 0.2 M triethylamine (Riedel-de Haen, Germany). CDAP was added with stirring and TEA was added dropwise during 90 seconds and
15 stirring for 120 s in total. The reaction was quenched by the addition of 30% acetone (4 times volume) and centrifuging at 12,400xg for 35 min. The particles were washed once with deionized water. 32 ml of t3 extract in 0.1 M NaHCO₃, pH 8.5, were added to 80 mg of the activated particles and coupling
20 was continued for 1 hour on a shaker table. Then the particles were centrifuged before they were deactivated with 0.05 M aspartic acid och 0.05 M glutamic acid in 0.1 M NaHCO₃, pH 8.5. Incubation on shaker table overnight at +4°C. The particles were washed by centrifuging in 1) 0.1 M NaHCO₃,
25 0.3 M NaCl, pH 8.5; 2) 0.1 M Na acetate, 0.3 M NaCl, pH 5; 3) 0.1 M NaHCO₃, pH 8.5; and 4) 20 mM Na borate, pH 8.5.

The particle concentration was determined spectrophotometrically at 600 nm with uncoated polystyrene particles as
30 reference.

Adsorption of anti-human IgE antibody to carbon particles

(carbon particle conjugate = Reactant*): Monoclonal anti-hIgE was adsorbed to carbon particles (sp100 from Degussa,

Germany). See Pharmacia AB, WO 96/22532. The ready suspension was diluted with buffer to 400 μg of carbon particles per ml.

Deposition of t3 particles on membrane in a detection zone:

5 On sheets of nitrocellulose with polyester backing (Whatman, 8 μm , 5 cm wide) 4% of the above-mentioned t3-coupled particles were applied with Linear Stripper (IVEK Corporation) with a flow of 1 $\mu\text{l/s}$ and 1 $\mu\text{l/cm}$ as a straight zone. The sheets were dried for 1 hour, 30°C, whereupon the sheets were
10 cut at right angles relative to the zone to 0.5 cm wide strips (Matrix 1201 Membrane Cutter, Kinematics Automation).

Deposition of hIgE particles in calibrator zones: On nitro-cellulose sheets with polyester backing (Whatman, 8 μm , 5 cm
15 wide) hIgE particles were deposited as parallel calibrator zones with Linear Stripper (IVEK Corporation, USA). The flow was 1 $\mu\text{l/s}$ and 1 $\mu\text{l/cm}$. Sheets intended for strips having only calibrator zones were coated with six parallel zones. hIgE concentrations in the zones were 0, 0.84; 3.4; 14; 54.2
20 and 217 ng hIgE/0.5 cm. Before performing the deposition the hIgE particles were diluted in borate buffer (20 mM, pH 8.5, Dextran T5000 4.2% w/w, sorbitol 5.8% w/w). All zones also comprised 1% phenyldextran-coated particles in order to yield the same amount of particles in each zone. On a separate
25 nitrocellulose sheet there was deposited a zone with hIgE particles (14 ng hIgE/0.5 cm, PIC = positive internal calibrator), and in a parallel zone t3 particles as above (detection zone). The deposition took place with the same parameter as for hIgE particles. The sheets were dried 1 h,
30 30°C, and were then cut, perpendicularly relative to the zones, to strips 0.5 cm wide (Singulator: Matrix 1201 membrane cutter, Kinematic automation, USA).

Test procedure: Strips were mounted on a plane plastic
35 surface. At the top (0.5 cm) on the strip a sucking membrane

was placed (width 3 cm, Whatman, 17 Chr). To obtain a constant pressure metal weights were put on the sucking membranes. 10 mm from the lower edge a 2 mm wide Inplastor strip was mounted (preglued polyester film). The Inplastor strip should prevent applied liquids from flowing out over too large a portion of the membrane. To the lower end of the strip there was applied 30 μ l of sample or buffer in the alternative. After suction of the sample volume the following components were applied in the given order: 15 μ l buffer, 15 μ l carbon particle conjugate as above and 30+30 μ l buffer. The buffer was: NaPO_4 0.1 M, BSA 3%, NaN_3 0.05%, sucrose 3%, NaCl 0.5%, phenyldextran 0.25%, bovine gammaglobulin 0.05%, pH 7.5. The degree of blackening of the reaction zones was measured as absorbance with ultroscan (Ultroscan XL, Enhanced Laser Densitometer, LKB).

Results

A) Activity determination on deposited IgE calibrator curve against IgE calibrators (24°C) run as samples on separate strips with anti-hIgE antibody in the binding zone.

Table 1:

	Deposited amount IgE	Calculated KU/L	Abs (x1000)*
25 1	0.84	0.27	46
2	3.4	0.48	109
3	14	0.71	266 used below as positive internal calibrator
4	54.2	2.7	619
30 5	217	66.3	1882

* = absorbance on a reaction zone after carbon particle conjugate having bound.

B) Determination of birch specific IgE antibody in patient samples run at 18, 24 and 37°C, with and without positive

internal calibrator (PIC) in order to adjust the standard curve (run at 24°C).

Table 2: Results (KU/L) with and without corrected calibrator
5 curve:

	Corrected			Not corrected		
	18°C	24°C	37°C	18°C	24°C	37°C
Sample 1	1.3	1.1	1.4	0.83	1.1	1.8
Sample 2	6.9	5.5	6.7	5.1	8.6	20

10

The results show that it is possible to compensate for the variation in the separate runs by using positive internal calibrators. In addition the results show that it is possible to use predeposited calibrators.

15

The embodiment shown in this example may be modified such that one or more of the following criteria are met, (a) has predeposited Reactant* in a zone of application and/or (b) has a zone of application of sample located downstream or
20 upstream of the zone of application of Reactant*, (c) has zones allowing simultaneous addition of Reactant* and sample.

**EXAMPLE 2: DETERMINATION OF BIRCH-SPECIFIC IgE WITH
FLUORESCENT DETECTION PARTICLES AND WITH A CALIBRATOR PRE-
25 DEPOSITED IN THE APPLICATION ZONE**

Methods and materials

Coupling of streptavidin to polystyrene particles:

Streptavidin (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden) were
30 covalently coupled to phenyldextran-adsorbed polystyrene particles with CDAP (1-cyano-4-dimethylaminopyridinium bromide) (Kohn J and Wilchek M, FEBS Letters 154 (1) (1983) 209-210), according to the description in Example 1 above for hIgE. The coupled particles were washed three times with 50
35 mM NaPO₄, 0.05 % NaN₃, pH 7.4. The particle concentration was

determined spectrophotometrically at A600 nm with untreated particles as reference.

Deposition of streptavidin-coupled particles on

- 5 nitrocellulose membranes: To nitrocellulose sheets with polyester backing (Whatman, 8 μ m, 5 cm wide) were applied with Linear Striper (IVEK Corporation) zones of:
- 1) streptavidin-coupled particles diluted to 1 % particle content i 10 mM NaPO₄, 5 % sucrose, 5 % dextran T5000, 0.01 %
- 10 NaN₃, pH 7.4;
- 2) t3-coupled particles, prepared according to Example 1, diluted to 4 % particle content in 50 mM NaPO₄, 10 % sucrose, 0.05 % NaN₃, pH 7.4. The deposition flow was 2.5 μ L/cm and the rate was 20 mm/sec.

15

The deposits were dried for 1 hour at 30°C, and the sheets were cut to 0.5 cm wide strips (Matrix 1201 Membrane Cutter, Kinematics Automation).

20 Coupling of anti-hIgE antibodies to detection particles:

- Antibodies to hIgE which had been cleaved with pepsin to fab'2 fragments were coupled to fluorescent polystyrene particles having aldehyde groups on their surface (Molecular Probes C-17177 TransFluoSpheres, aldehyde-sulphate
- 25 microspheres, 0.1 μ m, 633/720, 2 % solids). 23 mg of antibody were then coupled to 66 mg of particles in 50 mM NaPO₄ buffer, pH 6.5, overnight at room temperature, whereupon 205 μ L of NaCNBH₄ (5 M) were added to reduce the coupling for 3 hours at room temperature. Centrifugation was performed at
- 30 20,800 x g (50 min in Eppendorf 5417R, 14,000 rpm), and deactivation in glutamic acid 0.05 M and aspartic acid 0.05 M in deionized water, pH 6.5, was then carried out overnight with stirring at room temperature. After centrifugation at

20,800 x g for 50 min, blocking was performed with 0.2 % BSA in 50 mM NaPO₄, pH 7.4, with 0.05 % NaN₃, and incubation took place at +4°C. Centrifugation was then performed again at 20,800 x g for 50 min followed by two washes with blocking
5 buffer which was then also used for storage. The particle concentration was determined in a fluorimeter (Perkin-Elmer LS50B) with a standard curve prepared with the original particle. The coupled protein during the coupling was determined by having radioactive anti-hIgE present during the
10 coupling.

Biotinylation of hIgE: Biotinylation of hIgE was performed according to the conditions recommended by the supplier (Pierce). hIgE was desalted by gel filtration with PD-10
15 (Amersham Pharmacia Biotech AB) in 0.15 M KPO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.8. To 0.95 mL (0.59 mg) hIgE were added 0.010 mL biotin-LC-Sulfo-NHS (3.59 mM, Pierce). Incubation then took place at room temperature for 1 hour, whereupon the coupling reaction was quenched by the addition of 40 µL of 2 M glycine. The
20 mixture was then applied to a PD-10 gel filtration column equilibrated with 50 mM NaPO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.4. Yields and final concentration were calculated from the radioactivity as I-125-labelled hIgE was included in the coupling. The concentration of hIgE was analyzed by
25 immunochromatography and UniCAP tIgE (Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Sweden).

Deposition of biotinylated IgE on application filter: To application filters 5x5 mm (Whatman F075-14) were dispensed
30 0.006 mL of biotinylated IgE (1.6 ng) diluted in 50 mM NaPO₄, 0.15 M NaCl, 6 % BSA, 5 % lactose, 5 % dextran T5000, pH 7.4. The filters were dried at 30°C for 1 hour.

Test procedure: Strips were mounted to a surface inclined about 16° from the bench plane. Sucking membranes (3.5 cm wide, Schleicher & Schuell, GB004) were placed 0.5 cm into the upper end of the membrane. To obtain constant pressure, 5 metal weights were placed on the sucking membranes. Samples and reagents were then pipetted successively as described below. Each sample and reagent volume was sucked into the membrane before the following volume was pipetted.

- 10 1) 30 µL of 50 mM NaPO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.4.
- 2) A filter with predeposited biotinylated IgE was placed at the bottom of the strip.
- 3) 30 µL of patient serum were pipetted to each filter.
- 4) 20 µL of test buffer (0.1 Na-PO₄, 0.15 M NaCl, 10 %
- 15 sucrose, 3 % BSA, 0.05 % bovine gammaglobulin, 0.05 % NaN₃, pH 7.4) were added to the filter.
- 5) The application filter was removed.
- 6) 20 µL of detection conjugate (75 µg/ml) diluted in test buffer.
- 20 7) 2 x 30 µL of test buffer.
- 8) The fluorescence of the detection zone was measured as a response area (Vmm) with a scanning red laser fluorometer (635 nm).
- 25 Three positive t3-sera were selected and analysed in triplicate with three different conjugate batches. Signal areas obtained with nitrocellulose coated with different IgE particle concentrations (described in Example 1 above) run with conjugate 2 were used as a stored calibration curve.
- 30 PIC correction meant that the signal for the reaction zone for t3 was multiplied by PICexp/PICobs before reading against the stored calibration curve (master curve). PICexp was

defined as the average of the PIC signals obtained in the run with conjugate 2.

Results

5 Reading against Master curve for **uncorrected signal**

Serum	Conc (KU/L)	Average of triplicate		Between
	Conjugate 1	Conjugate 2	Conjugate 3	CV (%)
1	0.75	3.0	1.4	68
2	5.7	29.1	18.7	66
3	2.5	10.8	6.8	62

Reading against master curve for **PIC-corrected signal**

10

Serum	Conc (KU/L)	Average of triplicate		Between
	Conjugate 1	Conjugate 2	Conjugate 3	CV (%)
1	2.5	3.5	1.9	29
2	14.2	19.5	20.7	19
3	3.6	5.3	6.1	26

Between CV (%) is calculated as the variation of the three averages obtained for the different conjugates. The results show that the idea of a predeposited calibrator substance in the application zone is functional and that the use thereof as a PIC additionally gives a reduced between-assay-variation.

15

CLAIMS

1. A method in a process for the determination of an analyte in a sample involving utilizing biospecific affinity reactions, and comprising the following steps:
 - i. forming a complex comprising:
Reactant I---Analyte'---Reactant*, where
 - a. Reactant* and Reactant I exhibit biospecific affinity to the analyte,
 - 10 b. Reactant* is analytically detectable,
 - c. Analyte' is the analyte or an analyte related reactant, and subsequently
 - ii. determining the detectable signal from Reactant* in the complex (sample value), and
 - 15 iii. obtaining the amount of analyte in the sample by comparing the sample value with one or more calibrator values, each of which corresponds to a standard amount of analyte,

characterized in that before the determination of the

 - 20 calibrator value, either (i) the calibrator or (ii) a binder for the calibrator has been bound to a matrix, and when a binder for the calibrator has been bound to the matrix, calibrator is added or calibrator predeposited in the matrix is released at the determination of calibrator value, and
 - 25 that the matrix is insoluble in the liquid medium in which binding of Reactant* to the calibrator occurs.
2. The method according to claim 1, **characterized** in that calibrator has been bound to the matrix before the
 - 30 determination of calibrator value.
3. The method according to claim 1, **characterized** in that a binder for the calibrator has been bound to the matrix before the determination of calibrator value.

4. The method according to claim 1 or 3, **characterized** in that said binder for the calibrator is one member of a specific binding pair, and that the other member of the
5 specific binding pair is coupled or conjugated to the calibrator.

5. The method according any of claims 1 to 4, **characterized** in that the calibrator and the analyte have the ability to
10 biospecifically bind to Reactant* via equivalent binding sites.

6. The method according to any of claims 1-5, **characterized** in that

- 15 a. the matrix is a flow matrix exhibiting one or more calibrator zones (CZ1, CZ2, CZ3 etc.),
b. (i) each calibrator zone comprises calibrator in an amount corresponding to a standard amount of analyte, or
(ii) each calibrator zone contains calibrator binder,
20 the amount of calibrator binder and the amount of calibrator corresponding to a standard amount of analyte, and
c. Reactant* is bound to the calibrator by transporting Reactant* through the calibrator zones.

25

7. The method according to claim 6, **characterized** in the flow matrix is a lateral flow matrix.

8. The method according to claim 6 or 7, **characterized** in
30 that

- a. two or more of the zones CZ1, CZ2, CZ3 etc. comprising calibrator or binder for the calibrator are located in the same process flow, at least two of the zones

corresponding to different standard amounts of analyte,
and

- b. transport of Reactant* for binding to matrix calibrator in the various CZ takes place via this process flow.

5

- 9. The method according to claim 6 or 7, **characterized** in that

- a. separate calibrator zones (CZ) are located in separate process flows, and

- 10 b. transport of Reactant* for binding to calibrator
" in a calibrator zone CZ occurs via the respective process flow.

- 10. The method according to any of claims 8 or 9,
15 **characterized** in that

- a. the process flow and the process flows, respectively, lack a detection zone, and
- b. the complex is formed in a detection zone in a process flow lacking a calibrator zone and being present in a
20 matrix of the same type as the calibrator zones.

- 11. The method according to any of claims 1-5, **characterized** in that the matrix is a flow matrix, and in that, along one and the same process flow, there are

- 25 a. one or more calibrator zones (CZ), each of which exhibits a matrix calibrator or a matrix calibrator binder,
- b. one or more detection zones, none of which coincides with any calibrator zone, and in which a Capturer is
30 firmly anchored and is either Reactant I or a biospecific affinity reactant, which directly or indirectly is able to bind Reactant I biospecifically,

- c. an application zone for Reactant*, $A_{R*}Z$, which is located upstream of said CZ and DZ and to which Reactant* may have been predeposited, and
- d. an application zone for sample (A_SZ) which is located
- 5 i. upstream of or coinciding with a detection zone,
ii. downstream or upstream of or coinciding with $A_{R*}Z$ ($A_SZ/A_{R*}Z$), or
iii. upstream of, downstream of or coinciding with a calibrator zone,
- 10 wherein preferably the zone of application of sample (A_SZ) is located upstream of both detection and calibrator zones, and in that Reactant* is added to $A_{R*}Z$ if Reactant* is not predeposited, or buffer is added to $A_{R*}Z$ if Reactant* is predeposited, and sample is added to A_SZ , optionally premixed
- 15 with Reactant* if A_SZ and $A_{R*}Z$ coincide, such that analyte and Reactant* reach DZ at the same time, or such that analyte reaches DZ before Reactant*.
12. The method according to claim 11, **characterized** in that
- 20 the calibrator zone or zones (KZ) exhibit a calibrator binder, and that calibrator is pre-deposited upstream of the calibrator zone or zones.
13. The method according to claim 11 or 12, **characterized** in
- 25 that the process flow comprises two or more of said calibrator zones.
14. The method according to claim 11 or 12, **characterized** in that the process flow comprises one or two of said
- 30 calibrator zones, and in that the level of analyte in the sample is obtained by:
- a. having access to one or more separately obtained calibrator values, and

- b. comparing a calibrator value for a calibrator zone (Positive Internal Calibrator = PIC), being located in the same process flow as said detection zone, with one or more of the separately obtained calibrator values,
- 5 c. adapting the measurement signal from the detection zone to the deviation of the measurement signal for PIC from the separate calibrator values, and subsequently
- d. obtaining the level of analyte in the sample by comparing the adapted measurement signal from the
- 10 detection zone with one or more of the separately obtained calibrator values,
- or vice versa with respect to what has been adapted and compared in steps c and d.
- 15 15. The method according to any of claims 11-14, **characterized** in that
- a. $A_S Z$ is (i) common to $A_R^* Z$ ($= A_S Z / A_R^* Z$) or (ii) is located upstream of $A_R^* Z$, and
- b. for alternative (i) sample is premixed with Reactant* before it is added to the common zone $A_S Z / A_R^* Z$, or
- 20 sample is being added to the common zone $A_S Z / A_R^* Z$ containing predeposited Reactant*, and for alternative (ii) sample is added to $A_S Z$, which is located upstream of $A_R^* Z$ which in turn comprises predeposited Reactant*.
- 25
16. The method according to any of claims 6-15, **characterized** in that Reactant* has particles as analytically detectable group, and/or calibrator or calibrator binder and/or Capturer, if there is a detection zone, is/are
- 30 anchored to the matrix via particles.

17. The method according to any of claims 1-16,
characterized in that the analyte is an antibody directed to
Reactant I or to Reactant*, and

- a. Reactant* is an antibody directed to the analyte and
5 Reactant I is an antigen/hapten, when the analyte is an
antibody directed to Reactant I, and
b. Reactant* is an antigen or a hapten and Reactant I an
antibody directed to the analyte, when the analyte is an
antibody directed to Reactant*.

18. The method according to any of claims 1-16,
characterized in that the analyte is an antigen, and
Reactant* and Reactant I are antibodies directed to the
analyte.

19. The method according to any of claims 1-18,
characterized in that the method is performed as a part of
diagnosing allergy or autoimmune disease.

20. A device for transforming measured signal values of a
complexed, analytically detectable reactant (= Reactant*) to
real amounts of analyte in a sample, in connection with per-
forming an analysis method which utilizes biospecific
affinity reactions for the determination of the amount of
25 analyte in a sample, to form complexes comprising Reactant*
in an amount which is related to the amount of analyte in the
sample, **characterized** in that the kit exhibits:

a flow matrix in which there is an area of process flow
for the transport of Reactant*, and that there is in
30 this area

- i. one or more calibrator zones (CZ1, CZ2 etc.)
comprising a calibrator, or binder for the
calibrator, which is firmly anchored to the matrix,
the amounts of calibrator or calibrator binder,

- respectively, being different for at least two calibrator zones, and the calibrator exhibiting binding sites to which Reactant* is able to bind, when Reactant* is transported through a calibrator zone, and
- 5 ii. an application zone for Reactant* (A_{R*Z}) upstream of said one or more calibrator zones.

21. The device according to claim 20, **characterized** in that
10 a calibrator binder is firmly anchored in the matrix and that the device comprises calibrator predeposited upstream of the calibrator zone, for example in A_SZ .

22. The device according to claim 20 or 21, **characterized** in
15 the device comprises Reactant* predeposited in A_{R*Z} .

23. The device according to claim 20, 21 or 22, **characterized** in that the process flow comprises a detection zone (DZ) which is located downstream of or coinciding with
20 A_{R*Z} and comprises a firmly anchored Capturer via which Reactant* can bind to DZ, and a zone of application of sample (A_SZ) which is located upstream of or coincides with said DZ.

24. The device according to claim 23, **characterized** in that
25 A_{R*Z} is located upstream of or downstream of or coincides with A_SZ , where upstream or downstream locations are preferred.

25. The device according to any of claims 23-24,
30 **characterized** in that the firmly anchored reactant (Capturer) has biospecific affinity to the analyte or to an analyte-related reactant.

26. The device according to any of claims 23-24,
characterized in that the firmly anchored reactant (Capturer)
has biospecific affinity to a second reactant which in turn
has biospecific affinity to the analyte or to an analyte-
5 related reactant.

27. The device according to any of claims 23-26,
characterized in that said one or more calibrator zones are
located upstream of DZ.

10

28. The device according to any of claims 23-27,
characterized in that A₅Z is located upstream of all
calibrator zones.

15 29. A test kit, **characterized** in that the kit comprises a
device according to any one claims 20-28.

30. The kit according to claim 29, **characterized** in that the
kit comprises Reactant*.

20

31. The kit according to claim 29 or 30, **characterized** in
that the kit comprises calibrator when said device has
calibrator binder bound to the matrix.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 98/02464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: G01N 33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6: G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, PAJ, EPODOC, CA, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9709620 A1 (AGEN BIOMEDICAL LIMITED), 13 March 1997 (13.03.97) --	1-31
X	WO 9516914 A1 (APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V.), 22 June 1995 (22.06.95), See esp. page 14, line 24 - page 16, line 5 --	1-31
X	WO 9209892 A1 (APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V.), 11 June 1992 (11.06.92), See claims --	1-31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 March 1999

Date of mailing of the international search report

28 -03- 1999

Name and mailing address of the ISA:

Swedish Patent Office
Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM
Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Hampus Rystedt
Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 98/02464

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0253464 A1 (HYBRITECH INCORPORATED), 20 January 1988 (20.01.88), See esp. page 7, line 24 - line 43 -- -----	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

02/03/99

International application No.

PCT/SE 98/02464

Patent document cited in search report			Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO	9709620	A1	13/03/97	AU	6782596 A	27/03/97
				AU	PN527995 D	00/00/00
				EP	0864090 A	16/09/98
WO	9516914	A1	22/06/95	AT	169117 T	15/08/98
				AU	689174 B	26/03/98
				AU	1198895 A	03/07/95
				CA	2177362 A	22/06/95
				DE	69412137 D,T	21/01/99
				EP	0734527 A,B	02/10/96
				SE	0734527 T3	
				ES	2119369 T	01/10/98
				JP	9510774 T	28/10/97
				US	5856203 A	05/01/99
WO	9209892	A1	11/06/92	AT	163764 T	15/03/98
				AU	663062 B	28/09/95
				AU	8921691 A	25/06/92
				CA	2095245 A	23/05/92
				DE	69129035 D,T	13/08/98
				EP	0558680 A,B	08/09/93
				SE	0558680 T3	
				ES	2112898 T	16/04/98
				JP	6502720 T	24/03/94
EP	0253464	A1	20/01/88	US	5726064 A	10/03/98
				SE	0253464 T3	
				AU	658566 B	27/04/95
				AU	7044787 A	24/09/87
				AU	7727491 A	26/09/91
				CA	1286987 A	30/07/91
				DE	3779365 A	02/07/92
				ES	2042550 T	16/12/93
				GR	3005303 T	24/05/93
				JP	62231168 A	09/10/87

THIS PAGE BLANK (USPTO)